

Автономная некоммерческая организация
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ДИАГНОСТИКИ
И ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

На правах рукописи

КОНЦЕВАЯ НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА

**РАЗРАБОТКА ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА,
ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, РОТА-, КОРОНАВИРУСНОЙ БОЛЕЗНЕЙ И
ЛЕПТОСПИРОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, Лауреат
Государственной премии Российской
Федерации в области науки и техники
Г.Л. Соболева

Москва – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Краткая характеристика причин абортов у крупного рогатого скота.....	11
1.2 Распространенность и характеристика вирусов, вызывающих аборты и диарею у крупного рогатого скота.....	14
1.3 Распространенность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота.....	25
1.4 Ассоциированные вакцины, их особенности и преимущества.....	31
1.5 Средства для специфической профилактики абортов инфекционной этиологии и создания колюстрального иммунитета у крупного рогатого скота.....	34
Заключение.....	38
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
3.1 Распространенность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота в РФ.....	56
3.2 Разработка состава вакцин, технологической схемы и оптимального соотношения компонентов.....	60
3.2.1 Оптимизация состава вакцинных препаратов.....	60

3.2.2	Разработка технологической схемы изготовления и оптимального соотношения компонентов инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л.....	65
3.3	Изготовление и методы биологического контроля вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л.....	71
3.4	Контроль антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения.....	76
3.5	Оценка оптимальной дозы и сроков вакцинации крупного рогатого скота вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, изучение напряженности и продолжительности иммунитета у вакцинированных животных.....	79
3.5.1	Оценка активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л с целью профилактики абортос у крупного рогатого скота.....	80
3.5.2	Динамика превентивной активности сыворотки крови вакцинированных коров к лептоспирам.....	83
3.5.3	Оценка гуморального иммунного ответа у стельных коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, и телят.....	86
3.5.4	Определение иммунизирующей дозы вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для телят.....	91
3.6	Применение вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в производственных условиях.....	95
4.	ОБСУЖДЕНИЕ.....	101
5.	ВЫВОДЫ.....	112
6.	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	114
7.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115
	ПРИЛОЖЕНИЕ.....	137

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- КРС – крупный рогатый скот
- ИРТ – инфекционный ринотрахеит
- ВД – вирусная диарея
- КВ – коронавирус
- РВ – ротавирус
- МДБК – перевиваемая культура клеток почки теленка
- ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатогенная доза
- ЦПД – цитопатическое действие вируса
- ГАЕ – гемагглютинирующая единица
- РН – реакция нейтрализации
- РГА – реакция гемагглютинации
- РТГА – реакция торможения гемагглютинации
- РМА – реакция микроагглютинации
- ФБР – фосфатно-буферный раствор (0,01 М Na₂HPO₄, 0,15 М NaCl, рН 7,2-7,4)
- МПА – мясо-пептонный агар
- МПБ – мясо-пептонный бульон
- МППБ – мясо-пептонный печеночный бульон
- M.s. – Master seed
- W.s. – Working seed
- КВИ – коронавирусная инфекция
- РВИ – ротавирусная инфекция
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- P – Pomona
- T – Tarassovi
- G – Grippotyphosa
- S – Sejro

ВВЕДЕНИЕ

Интенсификация молочного животноводства и повышение молочной продуктивности коров часто сопровождается нарушением обмена веществ, что снижает резистентность организма, способствуя развитию иммунодефицитов, повышающих восприимчивость животных к инфекционным болезням [95, 87].

Добиться полной ликвидации тех или иных инфекционных болезней крупного рогатого скота (КРС) в настоящее время не представляется возможным, особенно это касается природно-очаговых заболеваний. Контролировать же развитие эпизоотического процесса, снижать его интенсивность, предупреждать потери от инфекционных болезней вполне возможно, используя знание закономерностей развития эпизоотического процесса каждой болезни.

Особую опасность среди инфекционных болезней представляют инфекционный ринотрахеит - пустулезный вульвовагинит (ИРТ-ИПВ), вирусная диарея (ВД) крупного рогатого скота, ротавирусная (РВИ) и коронавирусная (КВИ) инфекции и их ассоциации с лептоспирозом и рядом других болезней, протекающих нередко, латентно, не выявляемых своевременно, а потому бесконтрольно распространяющихся [155].

Вирусы инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирусной диареи (ВД) крупного рогатого скота (КРС) занимают особое место в связи с многообразием клинических проявлений и тяжестью течения вызываемых ими болезней [50, 193, 102, 137, 124].

Вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит, ротавирусная, коронавирусная инфекции и лептоспироз широко распространены во всем мире и опасны, в основном, для новорожденных телят. Смертность и выбраковка переболевших телят достигают 40-50% [147, 21].

Лептоспироз, вирусная диарея и инфекционный ринотрахеит, кроме того, являются абортгенными факторами, вызывающими аборты у КРС.

Величина экономического ущерба при этих заболеваниях, складывающаяся из падежа телят, снижения мясной и молочной продуктивности, уменьшения привесов, выбраковки животных, убытка от аборт, бесплодия и т.д., огромна, а терапевтические меры борьбы с уже возникшим заболеванием отсутствуют или малоэффективны. Поэтому в комплексе противоэпизоотических мер борьбы с вирусными инфекциями, такими как ИРТ, ВД, РВИ, КВИ, а также лептоспирозом КРС специфическая профилактика является ведущей. При лептоспирозе, кроме того, следует акцентировать внимание и на эпидемическом аспекте.

В изучении эпизоотологии, эпидемиологии, методов диагностики и средств специфической профилактики лептоспироза достигнуты значительные успехи. Несмотря на это, лептоспироз все еще остается серьезной экономической и социальной проблемой, наносит значительный материальный ущерб животноводству и постоянно угрожает здоровью и жизни человека. Подтверждением этого являются заболевания лептоспирозом людей в Москве (1992-1993), Алтайском крае (1998), Краснодарском и Ставропольском краях (1998-2002), Ростовской области (1998-2002) и других регионах России [55, 12, 85, 2].

В связи с ростом числа известных сероваров лептоспир и значительным импортом скота обязательным условием для успешной борьбы с лептоспирозом является необходимость постоянного мониторинга за состоянием и изменением этиологической структуры лептоспироза в каждом регионе [55, 81].

Целесообразность создания инактивированных комбинированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота обусловлена тем, что практически во всех регионах страны выявлены животноводческие хозяйства неблагополучные по этим болезням.

Целью работы является разработка и оценка эффективности

инактивированных комбинированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза (вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л), предназначенных для профилактики абортс инфекционной этиологии у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у потомства.

Основные задачи исследований.

1. Изучить распространенность и этиологическую структуру лептоспироза крупного рогатого скота в РФ.

2. Определить состав вакцин и соотношение вирусных компонентов и лептоспир в вакцинах.

3. Отработать иммунизирующую дозу вакцины для крупного рогатого скота:

а) определить напряженность и продолжительность иммунитета у животных в разные сроки после вакцинации;

б) определить оптимальные сроки вакцинации крупного рогатого скота;

в) определить превентивную активность к лептоспирам сыворотки крови коров и телят, взятой на разных сроках после вакцинации.

4. Изготовить и испытать опытно-промышленные серии вакцин на лабораторных и естественно-восприимчивых животных:

а) разработать методы контроля вакцин и нормативную документацию на препараты;

б) провести испытания экспериментальных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота в производственных условиях.

Научная новизна работы.

С учетом распространенности и этиологической структуры лептоспироза разработаны два новых вакцинных препарата против основных инфекционных агентов, вызывающих абортс у крупного рогатого скота и заболевания различной

степени тяжести у молодняка, различающиеся по антигенному составу. Определены совместимость и оптимальные соотношения вирусных и бактериального компонентов в составе препаратов. Вакцины предназначены для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза (вакцина КОМБОВАК 2+Л, патент РФ №015612), инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезнью и лептоспироза крупного рогатого скота (вакцина КОМБОВАК 4+Л, патент №015619). ФГУ «Федеральный институт промышленной собственности Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам» внес вакцины по данным патентам в реестр «Перспективные изобретения».

Практическая значимость исследований.

Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Экспериментально установлена иммунизирующая доза препаратов, сроки вакцинации крупного рогатого скота, показана их эффективность и возможность оценки на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Опытным путем установлена высокая иммуногенная активность препаратов для коров при иммунизации за 2-3 недели до осеменения и глубокоостельных коров. Установлено, что в экспериментальных и производственных условиях вакцинация данными препаратами обеспечивает выраженный протективный эффект у взрослого крупного рогатого скота и позволяет создать колостральный иммунитет у телят. На вакцины и штаммы разработана и утверждена нормативная документация.

Основные положения, выносимые на защиту.

Полученные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- изучение этиологической структуры лептоспироза;

- схему изготовления и контроля инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л;
- результаты исследований по изучению антигенных свойств компонентов, входящих в состав вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, на лабораторных и естественно-восприимчивых животных;
- эффективность применения разработанных инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в качестве средств специфической профилактики абортос у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у молодняка против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезнью и лептоспироза крупного рогатого скота.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы доложены на Московской Международной научно-практической конференции по лептоспирозу «Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных» (г. Москва, 2007); европейской встрече по лептоспирозу «Евролепто 2012» (г. Дубровник, 2012); десятом Международном конгрессе специалистов ветеринарной медицины (Украина, 2012); научно-производственных совещаниях ООО «Ветбиохим» и АНО «НИИ ДПБ» (г. Москва, 2009 – 2015 гг.).

Публикации.

По материалам диссертации опубликованы 6 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях по перечню ВАК РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 147 стр. компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, собственных результатов исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Материалы диссертации

иллюстрированы 26 таблицами и 4 рисунками. Список литературы включает 195 источников (102 отечественных и 93 зарубежных авторов).

Автор приносит глубокую благодарность руководству за возможность выполнения диссертационной работы, научному руководителю Лауреату Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники, доктору биологических наук Соболевой Г.Л. за научно-методическое руководство в организации и проведении исследований, выражает искреннюю признательность доктору ветеринарных наук, профессору Алиперу Т.И., Заслуженному деятелю науки РСФСР, доктору ветеринарных наук, профессору Сергееву В.А., доктору ветеринарных наук, профессору Орлянкину Б.Г., доктору ветеринарных наук, профессору Верховскому О.А. за консультационную помощь, всем сотрудникам за поддержку и помощь в работе.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Краткая характеристика причин абортс у крупного рогатого скота

Расширенному воспроизводству поголовья крупного рогатого скота и полному сохранению молодняка, которые являются основным условием успешного развития молочной отрасли скотоводства, мешает ряд факторов, обусловленных инфекционными болезнями, приводящими к нарушению функционирования репродуктивных органов.

Известно, что от 100 коров в год может родиться 120 телят. Тем не менее, на практике в крупных хозяйствах страны от 100 половозрелых самок получают в среднем 65 телят, при этом в стадо на ремонт вводят лишь 15% телок, что не обеспечивает воспроизводство поголовья. У каждой третьей коровы в матке при обследовании после осеменения не обнаруживают плода и межотельный период у них продолжается более 12 месяцев [71].

В дальнейшем проблемы биологии, и, в частности, воспроизводства, будут разрешаться за счет селекции, отбора и разведения потомства, способного адаптироваться к сильно меняющимся условиям окружающей среды. На данном этапе целесообразно отработать традиционные способы профилактики и лечения нарушений функций воспроизводительной системы у коров [69].

Разработанные научные рекомендации и практические мероприятия по лечению коров с гинекологическими нарушениями не утратили своей практической значимости. Однако их эффективность даже на молочных комплексах с научно обоснованными технологиями производства, судя по статистическим данным, невысока. Это свидетельствует о сложности и недостаточной изученности данной проблемы [48].

По мнению ряда авторов ни одна из самых опустошительных эпизоотий не приносит большего ущерба животноводству, чем яловость скота [17].

А.П. Студенцов с соавт. (1986) считает, что ущерб, наносимый в животноводстве бесплодием, превышает потери, вызываемые всеми заразными и незаразными болезнями.

Отдельные хозяйства по причине бесплодия коров и телок ежегодно недополучают 20-50% и более телят [42, 83].

А.В. Бесхлебнов (1976) указывает на то, что яловая корова недодает от 1/3 до 2/3 нормальной годовой продукции молока, а иногда и совсем не доится. Процент яловых коров в стаде совпадает с процентом потерь молока от стада в целом. При этом автор сообщает о том, что при уплотненных отелах среднесуточная продукция молока бывает на 21% больше, чем у тех самых коров при растянутых интервалах между двумя отелами. Это согласуется и с данными В.С. Шипилова (1976). От каждой яловой коровы хозяйства недополучают за год в среднем от 25% до 50% молока [17].

В настоящее время за основу принята классификация бесплодия, предложенная А.П. Студенцовым (1986). Согласно этой классификации, по этиологическому признаку и клиническому проявлению различают 7 основных форм бесплодия: 1) врожденное, возникающее вследствие аномалий развития полового аппарата животных, возникших в эмбриональный или фетальный периоды в результате неполноценности половых клеток; 2) старческое (на почве атрофических процессов в гениталиях в связи с преклонным возрастом животных); 3) алиментарное, обусловленное количественной или качественной недостаточностью, односторонним избыточным кормлением животных, поступлением с кормом ядовитых веществ; 4) климатическое, возникающее вследствие угнетения функции органов размножения неблагоприятным влиянием географических и климатических факторов, неудовлетворительных условий содержания животных; 5) эксплуатационное, связанное с неправильным использованием животных; 6) симптоматическое - на почве заболеваний половых

органов животных, обусловленных патогенными микроорганизмами; 7) искусственное, в частности, искусственно приобретенное, обусловленное несвоевременным или неправильным осеменением самок, иммунобиологической несовместимостью пар.

Эффективная коррекция воспроизводительной функции коров при патологии родов и послеродового периода с использованием соответствующих лечебных мероприятий и применением необходимых биотехнических приемов, является залогом предупреждения симптоматического бесплодия и, следовательно, увеличения производства животноводческой продукции [77, 90, 22].

Как правило, болезни крупного рогатого скота протекают по типу смешанных инфекций, обусловленных вирусными и/или бактериальными агентами или их сочетанием. Основную роль в возникновении вспышек инфекционных болезней играют вирусы ИРТ, ВД, рота-, коронавирусы и многие другие. Немаловажная роль в возникновении смешанных болезней КРС принадлежит бруцеллам, лептоспирам, микоплазмам, хламидиям, кампилобактериям и др. Источником возбудителей инфекционных болезней являются животные – вирусо- и бактерионосители, больные и переболевшие, которые выделяют возбудителей во внешнюю среду [1, 38, 47].

По нашему мнению, аборты инфекционной патологии играют важную роль в нарушении воспроизводительной функции у коров. Нередки случаи, когда аборт является единственным клиническим проявлением инфекционной болезни у КРС. Поэтому важно вовремя проводить диагностику и профилактику аборт, вызванных инфекционными агентами.

1.2 Распространенность и характеристика вирусов, вызывающих аборт и диарею у крупного рогатого скота

Инфекционный ринотрахеит - инфекционный пустулезный вульвовагинит (ИРТ-ИПВ) крупного рогатого скота - контагиозное вирусное заболевание, протекающее чаще в респираторной и генитальной формах. Респираторная форма проявляется в виде лихорадки, одышки, ринита, синусита, ларингита и трахеита, а генитальная - вульвовагинитов, абортов и маститов у коров, баланопоститов, орхитов у быков [40, 175, 164].

Большой экономический ущерб ИРТ-ИПВ наносит и в России. По сообщениям Аавер Э. и др. (1973, 1974), Андреева Е.В. (1974, 1976) неблагополучными по ИРТ и ИПВ признаны Астраханская, Волгоградская, Воронежская, Калининградская, Калужская, Курганская, Московская, Орловская, Пермская, Рязанская, Смоленская, Свердловская, Тверская, Тульская, Ярославская, Новосибирская области, Мордовская, Чувашская, Удмуртская республики.

В последнее время во многих хозяйствах стали регистрировать генитальную форму этого заболевания. Осуществление средств и методов борьбы с данной формой заболевания является актуальной задачей современной ветеринарной науки и практики [70].

По современной классификации возбудителем ИРТ является ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству Herpesviridae, роду Varicellovirus. Из патогенных для животных вирусов, в состав семейства Herpesviridae входят до 80 представителей. Наиболее вирулентным и распространенным представителем герпесвирусов является вирус ИРТ-ИПВ [4, 48].

Клиническую картину и инфекционный характер ИПВ КРС (под названием везикулярная сыпь) в Европе впервые описал Rohlwes в 1838 г. Подобное заболевание описал в 1895 г. Steddom, что свидетельствует о том, что ИПВ КРС

существовал до ИРТ как в Европе, так и в США [122, 175].

В пятидесятых годах двадцатого столетия R.J. Schroder и D.M. Moys (1954) описали на востоке США вспышку заболевания среди телят с поражением респираторного тракта, которое D.J. McKercher в 1955 г. охарактеризовал как инфекционный ринотрахеит. Годом позже вирус был выделен в культуре клеток из носовых секретов больных респираторными заболеваниями телят и затем идентифицирован [190].

J.H. Gillespie et al. (1959) доказали, что изоляты, выделенные из половых органов животных, способны вызывать поражения респираторного тракта телят, т.е. авторы доказали идентичность возбудителей ИРТ и ИПВ [107].

Таким образом, было доказано, что две клинические картины заболевания, обозначаемого как ИРТ-ИПВ КРС (в дальнейшем - ИРТ КРС), вызываются одним этиологическим агентом, известным в данное время как «Bovine herpes virus-1» (BHV-1) [139, 165].

В нашей стране заболевание, сходное с ИРТ КРС по клиническим и патологоанатомическим признакам, наблюдал Ф.М. Пономаренко в 1938 г. у группы телят, находившихся на откорме, и описал его в 1940 г. под названием «инфекционный катар верхних дыхательных путей».

Вирус впервые в СССР был выделен в 1969 г. Н.Н. Крюковым от больных телят в Тамбовской области. В этой же области впоследствии от телят были выделены еще несколько штаммов вируса [50].

Вирус ИРТ КРС впервые зарегистрирован в Сибири в 1989 г. Вирус был выделен от телят откормочного комплекса в Новосибирской области [24].

При заражении вирусом ИРТ стельных коров Darcel C. Le Q. et al. (1975), Wiseman A. et al. (1984) наблюдали аборт в 69% случаев. По наблюдениям Sorari W.V. et al. (1988) до 20% телят, родившихся от переболевших ИРТ коров, погибает от хронической гнойной пневмонии, сочетающейся во многих случаях с

развитием слепоты телят. Персистенция возбудителя у новорожденных сопровождается иммунодефицитами, понижением резистентности и жизнеспособности потомства, завершается нередко его падежом или вынужденным убоем [28].

Вирус ИРТ КРС характеризуется высокой контагиозностью, заболеваемость может составлять от 15-50% до 100%. Летальность при удовлетворительных условиях кормления и содержания не высокая (2-15%), но если болезнь осложняется секундарной микрофлорой или протекает с поражением центральной нервной системы, то гибель животных может достигать 50-100% [50, 63, 106, 111, 177, 159, 153, 173].

Эпизоотическая ситуация в России по ИРТ КРС осложнилась после завоза из-за рубежа в 90-е годы прошлого столетия на головные племпредприятия латентно инфицированных быков-производителей [24].

Известно, что крупный рогатый скот является основным хозяином вируса в природе. В то же время антитела к ВHV-1 выявляли в пробах сыворотки крови свиней, оленей, буйволов, антилоп, бегемотов, карибу, азиатских слонов, а также человека [32].

У телят заболевание проявляется чаще в респираторной форме [50, 4, 193, 190]. У новорожденных, заразившихся внутриутробно, болезнь протекает в виде вирусемии с некротическими поражениями внутренних органов и, возможно, выраженного гастроэнтерита [142]. У молодых животных иногда отмечаются менингоэнцефалиты [164, 28].

ИРТ тяжело протекает у новорожденных телят, полученных от не иммунных коров или не способных усваивать иммуноглобулины из молозива [154].

У взрослого крупного рогатого скота заболевание чаще протекает в генитальной форме. У быков ИРТ приводит к снижению продукции спермы,

баланопоститам, орхитам [4, 45, 107, 108, 117]. У коров регистрируют аборты, метриты, эндометриты, яловость, воспаление яичников, снижение массы тела и удоев [174, 183, 142, 167, 128, 152, 186, 189].

После первичного попадания вируса в организм вирусемия может быть кратковременной и продолжаться до появления антител. Ею можно объяснить заражение и гибель плода, так как вирус может преодолевать плацентарный барьер [155, 193].

Аборты, вызванные BHV-1, возникают в основном в последней трети стельности, часто без видимых предвестников [115, 151, 113]. Иногда им предшествуют конъюнктивит, незначительное повышение температуры тела или ринит [146, 187]. Интервал между заражением и выкидышем колеблется от 9 до 105 дней, что объясняется существованием различных механизмов проникновения вируса через плаценту [78, 143].

При пустулезном вульвовагините общее состояние животных угнетенное, снижаются аппетит, упитанность и удои, отмечают постоянную лихорадку в течение 3-8 дней после заболевания [187, 26]. При заражении в результате случки с больным быком или осеменении контаминированной вирусом ИРТ спермой, клинические признаки болезни появляются через 2-4 дня в виде гиперемии вульвы и влагалища, образования на ней пузырьковой сыпи [168]. По мере развития болезни пузырьки лопаются, из них вытекает желтоватый экссудат, образуются эрозии. Болезнь может осложниться гнойным воспалением. Продолжительность болезни около двух недель [170].

Н.Н. Новых и соав. (2004) сообщают о высокой яловости коров, переболевших генитальной формой ИРТ, обусловленной развитием оофоритов, сальпингитов, эндометритов, метритов и маститов, рассасыванием зигот, ранними и поздними абортами.

Wilke I., Letz W. (1970) отмечают ассоциативное проявление

конъюнктивита и вульвовагинита. В работе Dilovski M. (1975) сообщалось о том, что вирусом, выделенным из глаз, удалось экспериментально вызвать типичную пузырьковую сыпь (вульвовагинит). Болгарские исследователи [148] отражали наличие смешанных проявлений конъюнктивита с абортom и энцефалитом, кератоконъюнктивита с вульвовагинитом и респираторным синдромом [125].

BHV-1 передается аэрогенным [5], половым путем [86], а также трансплацентарно [194]. Больные животные выделяют вирус с экскретами, быки могут передавать возбудителя через сперму и заражаться на станциях искусственного осеменения через искусственную вагину. Заражение происходит через загрязненные корма, воду, предметы ухода и непосредственно при контакте больных и здоровых животных. В распространении болезни большую роль играют вирусоносители, которые не имеют клинических признаков болезни, но выделяют вирус во внешнюю среду [32].

Вирус ИПВ при генитальной форме инфекции выделяется от коров обычно в течение 14 дней, а от быков – более длительное время с ремиссиями, что позволяет вирусу проникнуть в сперму. Имеются сведения, что вирус выделяется из спермы клинически здоровых быков [172].

Опасность распространения возбудителя, по мнению Spradbrow P.R. (1968), особенно велика в связи с тем, что он выделяется не только со спермой, но и с другими секретами, в том числе с молоком уже на второй день после инфицирования.

Одной из самой распространенной форм инфекции является латентная. Латентная форма у быков-производителей представляет серьезную опасность для племенного животноводства [187, 86]. Латенцию можно определить как замаскированную персистенцию вируса в организме хозяина, которую невозможно выявить общепринятыми вирусологическими методами [155]. По определению В.А. Зуева (1979) при латентной форме инфекции нет полного цикла

репродукции вируса в организме. Размножение его прерывается после репликации вирусной ДНК или на уровне синтеза отдельных белков, когда при персистенции образуются инфекционные вирусные частицы, но инфицированные ими клетки не разрушаются [133, 104]. Вирус ИРТ-ИПВ представлен в данном случае ДНК-копиями, интегрированными с ДНК клетки – хозяина [138, 165, 139, 114, 116].

Латентная форма заболевания устанавливается, как правило, после острой первичной формы инфекции с персистенцией вируса в нервных ганглиях вблизи места первичного размножения: тройничном при респираторной и сакральном – при половой форме [176, 122, 150, 114, 126, 178]. Определенные эндо- и экзогенные факторы могут демаскировать вирус время от времени и он может выделяться во внешнюю среду через первично инфицированный орган [166]. Вирус может реактивироваться спонтанно, не теряя при этом своей патогенности [155, 123].

Вирусная диарея (ВД) – инфекционная контагиозная болезнь КРС, преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, ринитом, увеличением лимфоузлов, высокой лихорадкой, общим угнетением, лейкопенией, постоянной или перемежающейся диареей, эрозивным и язвенным стоматитом, слизисто-гнойными выделениями из носа. У коров возможны аборт [21, 25, 97].

В настоящее время болезнь признана экономически значимой и регистрируется практически во всех регионах Российской Федерации и странах СНГ в виде энзоотических вспышек [49, 41, 18, 43, 19, 98, 66, 102, 100, 60, 82].

Серопозитивность животных колеблется в пределах 60-100% [79, 23, 51, 99]. У серопозитивных животных болезнь может клинически не проявляться [67, 68]. Сероконверсию к вирусу ВД КРС в период острых вспышек удается выявить в 20-30% случаев [29].

В молочных стадах вирусная диарея обычно приводит к увеличению

репродуктивной патологии у коров и болезням телят, которые носят стационарный характер.

Возбудитель болезни относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae и существует в виде двух биотипов: цитопатогенного и нецитопатогенного, а также – двух генотипов: первого и второго [157, 162, 74].

Штаммы вируса первого генотипа, включающего 11 субгенотипов, распространены во всем мире [188], вирус второго генотипа ВД КРС представлен двумя субгенотипами и выделяется от больных животных значительно реже [161].

Впервые как самостоятельное заболевание ВД была определена в штате Нью-Йорк (США) в 1946 г при вспышке острой, часто со смертельным исходом болезни КРС, характеризовавшейся диареей и эрозийными поражениями желудочно-кишечного тракта [136, 13].

Долгое время ВД и болезнь слизистых (БС) считались разными заболеваниями, поскольку имелись существенные различия в клиническом проявлении. ВД рассматривалась как энзоотическая болезнь со спорадическими вспышками с высокой заболеваемостью, но низкой смертностью. А БС, наоборот, вызывала низкую заболеваемость, но смертность молодых телят достигала 100%.

Решающим в установлении антигенного родства двух вирусов было открытие того, что сыворотка КРС с типичными признаками БС или ВД могла нейтрализовать цитопатогенное действие (ЦПД) вируса в культуре клеток [132].

В России заболевание впервые было зарегистрировано и описано в 1967 г. К.Н. Бучневым, а затем В.Г. Макаревичем и В.П. Назаровым (1967).

Особенностью ВД является рождение персистентно инфицированных телят от инфицированных вирусом стельных коров. Персистентная инфекция устанавливается, если происходит инфицирование плода в первом триместре стельности до развития у него собственных лимфоидных тканей. У рожденных телят регистрируется виремия и они, практически пожизненно, выделяют вирус во

внешнюю среду со всеми секретами и экскретами организма. Вируснейтрализующие антитела у них не выявляются и их считают главным источником возбудителя инфекции [137, 127, 192, 27].

Вирус ВД легко преодолевает плацентарный барьер и вызывает у плода развитие патологических изменений, приводящих к морфологическим и функциональным нарушениям (церебральная гиперплазия, микрофтальмия, катаракта). У большинства телят, родившихся от больных матерей, еще до первой дачи молозива, имеются вируснейтрализующие антитела, что свидетельствует о внутриутробном инфицировании. Регистрируют гибель 6-8% новорожденных телят [130, 75, 76, 96].

В естественных условиях к инфекции восприимчив крупный рогатый скот, буйволы, олени, косули. Заболевает крупный рогатый скот в возрасте от 2 мес до 2-х лет независимо от пола. Взрослые животные относительно устойчивы к инфекции, но иногда болеют коровы, особенно после первого отела [18, 25, 37].

Вирус выделяется со спермой, калом, мочой, слюной, носовыми и глазными секретами. Новорожденным телятам вирус передается не только внутриутробно, но и через инфицированное молоко и фекалии. Передача через эмбрион – один из наиболее важных путей распространения ВД, что необходимо учитывать при специфической профилактике болезни [66, 68, 76].

По данным С.А. Жидкова с соавт. (1994,1995), К.П. Юрова с соавт. (2003), М.И. Гулюкина с соавт. (2007) наиболее характерными и экономически значимыми последствиями этой инфекции для индустрии скотоводства являются репродуктивные проблемы и болезни респираторного тракта.

Ротавирусная инфекция (РВИ) крупного рогатого скота – остропротекающая контагиозная болезнь новорожденных телят, характеризующаяся поражением ЖКТ. Возбудитель ротавирусной инфекции – РНК-содержащий вирус, отнесен к семейству Reoviridae, роду Rotavirus [131].

Семейство реовирусов (Reoviridae) объединяло сначала два рода – *Reovirus* и *Orbivirus*, обладающих многими общими свойствами. Впервые обнаружившие при гастроэнтерите человека реовирусоподобный агент R. Bishop, G. Davidson и соавт. (1973) отнесли его к орбивирусам. Их дальнейшие исследования показали отличия нового вируса от типичных представителей, как рода *Reovirus*, так и рода *Orbivirus*. Поэтому в 1975 г они предложили отнести сходные вирусы – возбудители гастроэнтеритов человека и животных к самостоятельному роду *Duovirus* в семействе *Reoviridae*. T. Flewett, A. Bryden и соавт. (1974) несколько раньше предложили для этой группы вирусов родовое название *Rotavirus*. Оно было принято в 1975 г Международным комитетом по таксономии вирусов как название отдельной группы в семействе *Reoviridae*. В 1978 г ротавирусы животных различных видов и человека были выделены в самостоятельный род *Rotavirus* семейства *Reoviridae* [39].

В естественных условиях ротавирус вызывает заболевание телят в возрасте от 2 дней до 6-8 недель [110, 169], реже, до 6 месяцев [118, 181], чаще же всего болеют телята первых двух недель жизни [141, 119, 135, 89, 103].

Считается, что ротавирусная инфекция проявляется у молодняка в возрасте 3-14 дней в умеренной форме. Симптомы заболевания при ротавирусной инфекции телят неотличимы от диарей других этиологий. Отличием от коронавируса является то, что последние поражают животных более старшего возраста [119].

По мнению большинства исследователей, заражение ротавирусами происходит после рождения, алиментарно. Передача инфекции осуществляется путем прямого контакта, через обслуживающий персонал и загрязненный инвентарь.

По данным авторов [156] телята до трехмесячного возраста выделяют ротавирус в значительных количествах без видимых симптомов диареи, участвуя,

таким образом в поддержании ротавирусной инфекции в стаде. Источником инфекции могут являться также коровы-вирусоносители [129]. Основным источником инфекции являются фекалии диарейных телят [156].

В хозяйствах Московской области обследовано 280 телят с симптомами диареи, в 36,2% проб фекалий обнаружен ротавирус, что указывает на наличие ротавирусной инфекции среди животных [8].

Рядом исследователей [147] антитела к ротавирусу обнаружены у КРС в некоторых хозяйствах в 40-100% случаев, что свидетельствует о контакте с данным возбудителем.

Коронавирусная инфекция (КВИ) крупного рогатого скота широко распространена во всем мире [191, 195, 182]. Впервые коронавирус (КВ) обнаружен в штате Небраска (США) группой исследователей Линкольнского университета в 1971 г. Возбудитель коронавирусной инфекции РНК-содержащий вирус, который относится к роду *Coronavirus* семейства *Coronaviridae*, включающему многочисленных представителей оболочечных вирусов, объединенных на основе молекулярно-генетических, структурно-морфологических и серологических свойств. Большинство коронавирусов обладают выраженным тропизмом к клеткам эпителия дыхательных путей и кишечного тракта [109, 74].

Первые сообщения в России по выявлению КВ КРС были сделаны О.В. Богатыренко в 1976 г. Антитела к данному вирусу обнаружены у большинства взрослых животных [163]. КВ КРС выявляется как у больных (от 8 до 69%), так и у здоровых телят (от 5 до 24%) [171, 145]. Однако, по мнению отечественных авторов [16, 61] заболеваемость новорожденных телят может достигать 100%. Часто КВ КРС обнаруживается в диарейных фекалиях вместе с другими энтеропатогенными возбудителями, в частности с ротавирусом.

Хотя КВ КРС в фекалиях клинически здоровых взрослых животных не

обнаруживается в больших количествах, телята, рожденные от животных-вирусоносителей, могут заболеть с большой вероятностью [112].

В естественных условиях болеют телята в возрасте 8-9 дней. При заражении коронавирусами у телят развивается диарея. До появления диареи у зараженного теленка наблюдаются депрессия и анорексия. Клинически здоровые взрослые животные могут быть хроническими носителями вируса, выделяя его с фекалиями в течение 3 месяцев.

В условиях экспериментальной инфекции у телят, не получающих молозива, диарея развивается через 18-24 ч после заражения [119, 62].

Отмечается цикличность вспышек болезни в отдельных хозяйствах с интервалом в 3-4 года, когда заболевание охватывает телят всех возрастов. Наиболее широко и остро болезнь протекает в зимне-весенний стойловый период, особенно при массовых отелах. Смертность телят в это время может достигать 15%, а выбраковка переболевших, из-за невозможности восстановления нормального развития и планируемых привесов, может составлять 40% [21].

1.3 Распространенность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота

Лептоспироз - зооантропонозная природно-очаговая инфекционная болезнь животных многих видов и человека, характеризующаяся у животных преимущественно бессимптомным течением, в редких случаях – кратковременной лихорадкой, желтухой, гемоглобинурией, которые при определенных условиях могут носить массовый характер, абортами, геморрагическим диатезом, некрозами слизистых оболочек и кожи.

Болезнь имеет широкое распространение во многих странах мира и в различных регионах России.

В Европе наибольшая инфицированность животных выявлена в Великобритании (35,21%), Ирландии (34,50%), Франции (31,21%), Румынии (30,41%). Менее 10% инфицированных животных в Югославии (4,12%), Чехии (7,40%), Италии (6,17%), Венгрии (7,51%). Преобладают реакции с лептоспирами четырех серогрупп: *Sejroe* и *Hebdomadis* (50,72%), *Icterohaemorrhagiae* (19,34%) и *Grippotyphosa* (19,05%).

В Азии антитела выявлены к лептоспирам у крупного рогатого скота в 14,63% случаев. Распространены лептоспиры серогрупп: *Sejroe* и *Hebdomadis* (25,38%), *Icterohaemorrhagiae* (25,71%) и *Autumnalis* (17,32%).

В Северной Америке инфицированность лептоспирами составила 15,75% от числа обследованных. Основными возбудителями лептоспироза у крупного рогатого скота являются *Sejroe* (56,30%) и *Pomona* (19,80%); на Кубе – *Canicola* (57,0%), *Tarassovi* и *Grippotyphosa* (по 20%); в Мексике – *Tarassovi* (21,20%).

В Южной Америке инфицированность лептоспирами составила 47,27%. Основными возбудителями были *Hebdomadis*, *Sejroe* (62,58%) и *Pomona* (17,38%), в Колумбии – *Canicola* (82,33%).

В Австралии лептоспироз имеет достаточно широкое распространение

(50,67%). Возбудителями являются лептоспиры двух серогрупп: *Canicola* (51,80%) и *Sejroe* (43,52%).

В Африке специфические антитела к лептоспирам выявлены у крупного рогатого скота в 29,57% случаев, а по отдельным странам от 4,13% (Египет) до 82,46% (Кения). Антитела обнаружены к *Hebdomadis* и *Sejroe* (30,06%), *Icterohaemorrhagiae* (17,39%), *Grippotyphosa* (16,28%) [57].

Проблемой лептоспироза животных в Российской Федерации занимались С.Я. Любашенко (1940, 1948, 1950, 1965), В.И. Терских (1940, 1941, 1945), А.Г. Малявин (1956, 1963, 1964), Е.Н. Горшанов (1971), А.Н. Панин (1972-2002), Ю.А. Малахов (1974, 1975, 1978, 1979, 1992, 2001), И.А. Болоцкий (1998) и др.

По данным ряда авторов к началу 80-х годов лептоспироз крупного рогатого скота достиг наибольшего распространения, помимо традиционно неблагополучного Северного Кавказа, в Уральском, Волго-Вятском, Центральном районах, а также Казахской и Молдавской ССР, республиках Средней Азии. Значительное количество инфицированного крупного рогатого скота было в Белоруссии (35,1%), Молдавии (29,1%), Таджикистане (30,0%), Украине (25,4%), наименьшее - в республиках Прибалтики (9,1%) и Киргизии (7,1%) [55].

Инфицированность лептоспирозом крупного рогатого скота в РФ остается достаточно высокой и составляет 16,6%. Этиологическая структура представлена лептоспирами серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Tarassovi*, *Romona* и *Grippotyphosa*. На неблагополучных фермах от 27 до 92% исследованных животных имели специфические антитела к лептоспирам.

Основными возбудителями лептоспироза у крупного рогатого скота на уровне сероваров являются лептоспиры *hardjo* и *romona*. Они встречаются на всей территории России и в большинстве стран. Первый вызывает аборт, преждевременные роды и мертворождаемость, второй, кроме того, спорадические вспышки иктерогемоглобинурии у телят [94, 92, 57].

По сообщениям ряда исследователей, для лептоспироза характерны территориальная приуроченность и гостальная специфичность возбудителей, т.е. лептоспиры определенных сероваров являются источником возбудителя инфекции (резервуаром) для животных разных видов [101, 3, 54].

В разных регионах России уровень распространенности лептоспироза среди сельскохозяйственных животных неодинаков и колеблется от 1,6 до 27,3% [7, 9, 11].

Farina и Andreani (1983) отметили, что лептоспироз крупного рогатого скота, который ранее почти не наблюдался, становится все более и более опасным. У ряда животных проявляется в острых и тяжелых клинических формах, характеризующихся, особенно у телят, анемией и гемоглобинурией; у стельных коров вызывает аборт, а у лактирующих – уменьшение удоя и нетипичный мастит. Чаще всего лептоспироз протекает бессимптомно, что является очень опасным в плане эпидемиологии, особенно у женщин во 2-3-ем триместре беременности [3].

Лептоспиры играют весьма значительную роль в патологии воспроизводства. Они вызывают аборт, рождение мертвых или нежизнеспособных телят, прохолосты и т.д. Аборт могут происходить в разное время после заражения и на любой стадии стельности, чаще во второй половине стельности. Иногда аборт бывает единственным клиническим признаком инфекции. Аборт могут носить массовый характер при введении лептоспироносителей в благополучное стадо [121].

У сельскохозяйственных животных лептоспироз как самостоятельное заболевание подробно описан в 40-50-х годах 20-го века. У крупного рогатого скота иктерогемоглобинурию впервые в 1935 году зарегистрировали С.Н. Никольский, Ф.М. Десятов, Г.Ф. Марченко на Северном Кавказе. В 1939 году В.И. Терских доказал роль лептоспир в этиологии иктерогемоглобинурии у крупного

рогатого скота, выделив культуру от теленка. Лептоспироз крупного рогатого скота описывали А.Г. Шакарян с соавт. (1937) в Армении, А.А. Авроров и М.В. Земсков (1937) в Воронежской области, М.М.Фарзалиев, М.М. Халимбеков (1939) в Азербайджане, Н.Д. Худайбердиев (1952) в Узбекистане и т.д. [56].

Классификацию лептоспир, основанную на антигенном различии отдельных штаммов, предложили Wolff и Broom (1954) и описали 34 серотипа и 12 серологических групп. Эта классификация была принята Международным подкомитетом по таксономии и номенклатуре ВОЗ и, совершенствуясь, существует в наши дни. Список, опубликованный научной группой ВОЗ в 1975 году, включал уже 124 серовара патогенных лептоспир, разделенных на 18 серологических групп.

В 1982 году Международный подкомитет по таксономии лептоспир и спирохет выделил лептоспиры в самостоятельное семейство *Leptospiraceae* в порядке *Spirochaetales*. В него включен род *Leptospira*, объединяющий 2 вида: *L. interrogans* - патогенные лептоспиры, резервуаром которых являются животные-носители и *L. biflexa* - лептоспиры сапрофиты. Данная классификация лептоспир основана на их антигенной структуре, а основной таксономической единицей является серологический вариант. В настоящее время насчитывается более 230 серовариантов лептоспир, объединенных в 23 серогруппы [93, 54].

Международным подкомитетом по таксономии в последние годы предложена альтернативная система видовой классификации лептоспир, основанная на новой концепции определения вида у эубактерий, в соответствии с которой к одному виду относят штаммы с ДНК – гомологией более 70%. На основании проведенных опытов по гибридизации ДНК более 200 штаммов патогенных лептоспир различных сероваров выделены 9 геномных видов, степень гомологии между которыми варьирует от 7 до 56% [3]. Мировые данные заболеваемости людей и животных указывают на убиквитарное распространение,

а также выраженное эпидемическое и эпизоотическое проявление возбудителей 3-х из 9-ти известных геномных видов лептоспир (*L. Interrogans*- серовары *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola* и *pomona*, *L. Kirschneri* – *mozdok* и *grippotiphosa* и *L. Borgpeterseni* – *tarassovi* и *hardjo*, *L. Noguchii*, *L. Weilli*. *L. Santarosai*, *L. Alexanderi*, *L. Kmetyi*).

Различают острое и хроническое течение болезни. На долю острых форм лептоспироза приходятся единичные случаи, большинство животных переболевает бессимптомно и становится лептоспиноносителями. При остром течении температура поднимается на 1-2,5⁰С выше нормы и остается на таком уровне до 4-5 дней. Лихорадка сопровождается депрессией, нарушением приема корма, слабостью, конъюнктивитом, анемией и, довольно часто, диареей. В более тяжелых случаях развивается гемоглобинурия, появляется желтушное окрашивание слизистых и кожи. Клинические признаки болезни обычно развиваются у молодняка. У взрослых животных, как правило, бессимптомная (абортивная) форма болезни, которая протекает легко и остается незамеченной. Отмечается небольшое и кратковременное повышение температуры тела, легкое угнетение, иногда незначительная желтушность и окрашивание мочи в бледно-розовый цвет. Все эти симптомы болезни исчезают через несколько дней, и животное выздоравливает, однако при таком течении часто имеют место аборт и агалактия [120].

С описанием лептоспироза, как самостоятельной нозологической единицы, особое внимание уделялось наличию клинических признаков (лихорадка, аборт и др.), из поля зрения выпадали животные с бессимптомным течением, лептоспиноносители, которых постоянно обнаруживают как на неблагополучных, так и благополучных по лептоспирозу фермах. Это подтвердило необходимость использовать при оценке эпизоотической ситуации понятие инфицированность [56, 31, 11, 36].

Анализ и частота клинических проявлений лептоспироза, количество инфицированных животных позволили Ю.А. Малахову (1978) сформулировать следующий постулат. При лептоспирозе типичные симптомы болезни (иктерогемиoglobinурия, наличие абортoв, мертворождений, маститы) проявляются лишь у незначительной части животных, исчисляемой всего лишь десятками или сотнями голов, тогда как десятки и сотни тысяч – это инфицированные животные, имеющие антитела и животные-лептоспиноносители. Лептоспиноносительство составляет 1-7%, в южных регионах - 10-50% и более. Клинически больные животные менее опасны, поскольку их легко выявить и изолировать. Намного сложнее с инфицированным поголовьем, не имеющим клинических признаков лептоспироза и являющихся источником возбудителя инфекции для здоровых животных и человека. Данная тенденция сохраняется и на современном этапе, что подтверждают изучением эпизоотической ситуации применительно к лептоспирозу животных [81, 30].

Основанием для постановки диагноза на лептоспироз служат клинические признаки, патологоанатомические изменения характерные для этой инфекции, обнаружение специфических антител в крови животных. Диагноз лептоспироза во всех случаях должен быть подтвержден лабораторными исследованиями [53].

1.4 Ассоциированные вакцины, их особенности и преимущества

Вакцинация является важным компонентом противоэпизоотических мероприятий и осуществляется во всех странах с развитым молочным животноводством [158, 185], а ее схемы должны разрабатываться конкретно для каждого хозяйства с учетом индивидуальных особенностей стада [134].

При формировании хозяйств промышленного типа с большой концентрацией скота на ограниченных площадях встает необходимость в сжатые сроки получить поголовье животных невосприимчивых одновременно к нескольким инфекциям. В таких условиях моновакцины не дают желаемого эффекта. Становится очевидным постоянный поиск и создание ассоциированных вакцин, содержащих в одной иммунизирующей дозе антигены нескольких возбудителей болезней, введение которых обеспечило бы формирование иммунитета одновременно к нескольким инфекциям. Так как эпизоотическая ситуация по тем или иным заболеваниям КРС в каждом отдельно взятом регионе страны разная, то и при создании ассоциированных вакцин необходимо строго учитывать распространенность заболеваний для каждого региона отдельно [74].

В практических условиях при проведении оздоровительных мероприятий большое значение имеет не только тип вакцин, но и рациональные схемы их применения [10, 144, 179, 124, 91].

Иммунопрофилактика основных инфекционных болезней (ИРТ, ВД, РВИ и КВИ) сыграла исключительную роль в нормализации эпизоотической обстановки [85, 14].

При смешанных инфекциях трудно определить ведущую роль того или иного инфекционного агента, поэтому наиболее эффективным средством профилактики таких болезней являются комбинированные вакцины, включающие как вирусные, так и бактериальные компоненты.

Впервые метод одновременных прививок предложили французские ученые

Widal и Siceard в 1897 г. Они с положительным результатом провели одновременную вакцинацию против брюшного тифа и холеры.

Сообщение Ramon и Zoller (1926) о возможности одновременной вакцинации против столбняка, брюшного тифа и паратифа «А» и «В» положило начало созданию ассоциированных вакцин, отрицая явление «конкуренции антигенов» [160]. Однако, явлению «конкуренции антигенов» и неблагоприятному воздействию одного антигена на другой при их совместном введении посвящены работы Michaelis, Priedberger (1904), Imai (1925), Ylenny и Waddington (1926).

По способу получения вакцины делятся на живые (аттенуированные), инактивированные (убитые), субъединичные (химические) и генно-инженерные. По количеству антигенов вакцины бывают моновалентные, поливалентные и ассоциированные. Кроме того, существуют различные способы инаktivации и депонирования вакцин. У каждого вида вакцин есть как преимущества, так и недостатки, о которых уже много написано в различных источниках.

Применение живых вакцин считается наиболее перспективным, однако опасность таких вакцин связывают с потенциальной абортотенностью многих из них, в связи с возможной реверсией вакцинного штамма в исходное состояние и другими аспектами их применения. Инактивированные вакцины безопасны, но их необходимо применять первично дважды и ревакцинировать, по крайней мере, ежегодно [74].

Живые вакцины индуцируют сбалансированный иммунный ответ и долговременную иммунную память. Инактивированные вакцины вызывают гуморальный иммунный ответ и относительно кратковременную иммунную память, однако клеточный иммунный ответ также является важным механизмом защиты, поскольку инфицированная вирусом клетка при этом может элиминироваться до гематогенного распространения. Кроме того, индукция Т-клеток иммунной памяти имеет решающее значение для долгосрочного

длительного иммунитета [184].

Ассоциированные вакцины, созданные с учетом иммунологической совместимости антигенов, повышают их профилактическую эффективность, кроме этого, обеспечивают экономию за счет снижения затрат труда, материалов, транспортировки. Рациональные схемы их применения снижают потери продуктивности и потери в весе от воздействия стресс-факторов, связанных с иммунизацией животных [74].

На протяжении нескольких десятилетий, как в нашей стране, так и за рубежом создано и применяется большое разнообразие ассоциированных вакцин, некоторые из них будут представлены ниже. Практика показала отсутствие реактогенности при правильном их использовании. Поствакцинальный период, как правило, проходит без каких либо осложнений. Иммунитет формируется в те же сроки и такой же продолжительности, как и при введении моновакцин. Таким образом, ассоциированные вакцины во всех отношениях являются полноценными и высокоэффективными препаратами.

1.5 Средства для специфической профилактики аборт инфекционной этиологии и создания колюстрального иммунитета у крупного рогатого скота

Вакцинация играет важную роль в борьбе с вирусной диареей и инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота. Ликвидация данных инфекций без вакцинопрофилактики труднодостижима или невозможна из-за широкой инфицированности, длительного латентного носительства и выделения вируса, высокой численности и плотности поголовья животных в хозяйствах.

В качестве средств специфической профилактики инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи применяют живые, инактивированные и живые маркированные вакцины. Также уместно применение комбинированных живых и инактивированных вакцин. Инактивированные вакцины лишены недостатков живых вакцин, но и создаваемый ими иммунитет менее напряженный и непродолжительный. Наиболее широкое применение получили живые вакцины из аттенуированных штаммов вирусов. В последнее время для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и других массовых вирусных болезней крупного рогатого скота во многих странах широко используют комбинированные живые и инактивированные вакцины [34, 15, 33].

Специфическую профилактику ротавирусной и коронавирусной инфекций рекомендовали проводить живой комбинированной вакциной против рота- и коронавирусной инфекций, однако предпочтительнее использовать инактивированные вакцины. Инактивированные комбинированные вакцины, содержащие в себе штаммы рота- и коронавирусов пригодны для вакцинации стельных коров и создания колюстрального иммунитета [74].

Первую вакцину против лептоспироза предложили в 1916 г. Wani, Ido, Noki в Японии для профилактики лептоспироза у шахтеров. Первоначально это была суспензия печени зараженных лептоспирозом морских свинок, а затем культура,

выращенная на сывороточной среде и инактивированная формалином [105, 180, 6].

Вакцинация против лептоспироза животных в Советском Союзе начата в 1947 г. бивалентной хиназоловой вакциной из лептоспир серологических групп *Romona* и *Grippotyphosa* (С.Е. Любашенко). В последующие годы А.Г. Малявин, В.С. Соловьева и другие ввели в состав вакцины лептоспиры серологических групп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* (1952-1956гг.), *Tarassovi* (1959-1962гг.), *Hebdomadis* и *Bataviae* (1965-1966 гг.). Вакцину выпускали до 1976 г. в трех, а затем в двух вариантах, каждый из которых включал лептоспиры четырех серологических групп, общее количество штаммов в вакцине достигало сорока двух. Ее вводили двукратно, продолжительность иммунитета у вакцинированных животных не превышала 2-4 месяца [81, 58].

В 1978 г. вместо феноловой вакцины внедрили депонированную вакцину ВГНКИ, в которой использовали вместо 42 только 6 штаммов лептоспир. Вакцина при однократном введении вызывала формирование иммунитета большей напряженности и продолжительности, чем феноловая вакцина при двукратной инъекции. В 1990 г. была внедрена концентрированная вакцина против лептоспироза, которая не получила широкого практического применения из-за выпадения не разбивающегося осадка при длительном хранении. В 1996 г. была выпущена лиофилизированная вакцина против лептоспироза животных, преимуществом которой является небольшая иммунизирующая доза (0,5-2,0 мл), высокая иммуногенность, экономия в таре и перевозке, устойчивость к замораживанию [65, 12].

Также существует ряд ассоциированных вакцин для животных, включающих в себя кроме лептоспир вирусы или бактерии [57].

Ramon и Descombeу (1930) установили способность организма животных отвечать на одновременное введение большого количества антигенов. В

дальнейшем это подтверждено в работах отечественных ученых – Н.Ф. Гамалеи (1939), В.А. Крестовникова, П.Ф. Здродовского, Н.Г. Ключева (1956), Б.Г. Трухманова (1964) и др. 60-70 гг. прошлого столетия ознаменованы значительным арсеналом отечественных вакцин, многие из которых применяют и по сей день.

Для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций применяют как моновакцины, так и вакцины с различным сочетанием данных возбудителей. Кроме вирусных антигенов в вакцины включены и бактериальные компоненты. Ниже представлен список некоторых применяемых в России ассоциированных вакцин отечественного и импортного производства (таблица 1):

Таблица 1

**Вакцины против вирусных и бактериальных болезней
крупного рогатого скота**

Наименование вакцины	Производитель/разработчик	Вид вакцины
Вакцина комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней телят (Комбовак)	ООО «Ветбиохим», г. Москва	инактивированная
Вакцина комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза телят (Комбовак-Р)	ООО «Ветбиохим», г. Москва	инактивированная
Вакцина комбинированная против вирусной диареи, рота-, и коронавирусной болезней и эшерихиоза телят (Комбовак-К)	ООО «Ветбиохим», г. Москва	инактивированная
Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи-болезни слизистых оболочек и парагриппа-3 крупного рогатого скота поливалентная сухая «Тривак»	ФГУП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь	живая
Вакцина ассоциированная против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота	ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир	инактивированная

эмульсионная		
Вакцина против ротавирусной и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота сорбированная	ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир	инактивированная
Ассоциированная вакцина против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и хламидиоза крупного рогатого скота эмульсионная	ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных-ВНИВИ», г. Казань	инактивированная
Ассоциированная вакцина против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота культуральная жидкая - ВНИИВВиМ	ГНУ ВНИИВВиМ РАСХН, г. Покров	инактивированная
Вакцина против ротавирусного, коронавирусного энтеритов телят и вирусной диареи крупного рогатого скота «РОДИКОР-ВАК ВИЭВ»	ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко, г. Москва	инактивированная
Вакцина «Кэтлмастер Голд FP5 L5» для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза крупного рогатого скота	«Pfizer Animal Health», США	живые аттенуированные возбудители ИРТ, ПГ-3 и РС инфекции, инактивированные возбудители ВД и лептоспиры серогрупп Canicola, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona
Вакцина «Бови-шилд Голд FP5 L5» для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза у крупного рогатого скота	«Pfizer Animal Health», США	живые аттенуированные возбудители ИРТ, ВД, ПГ-3, РС инфекции и инактивированные лептоспиры серогрупп Canicola, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona
Вакцина Скоугард 4 КС для профилактики коронавирусной и ротавирусной инфекций, колибактериоза и клостридиоза у телят	«Pfizer Animal Health», США	инактивированная
Вакцина РОТАВЕК КОРОНА против рота-, коронавирусной инфекций и эшерихиоза	«Schering-Plough Central East A.G.», Швейцария/ «Essex Animal Health», Германия	инактивированная

Комбинация иммунизирующих агентов должна формироваться с учетом эпизоотической ситуации в стране. Кроме того, необходимо учитывать особенности возбудителей, идентичность клинических проявлений болезни,

быстроту постановки диагноза и другие аспекты.

Изготовлению вакцин, содержащих лептоспирозный компонент, должно предшествовать изучение этиологической структуры лептоспироза с учетом сероваров лептоспир, которые циркулируют у животных в данном регионе. Следует отметить, что лептоспироз, вызываемый лептоспирами различных сероваров и серогрупп, наносит неравнозначный экономический и социальный ущерб. Например, в Северной Италии, среди крупного рогатого скота широко распространены лептоспиры серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, но они не вызывают симптомов болезни, при этом, лептоспиры серогруппы *Romona*, которые регистрируются значительно реже, чаще приводят к серьезным вспышкам лептоспироза, нередко с летальным исходом. Лептоспиры *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae* в России вызывают спорадические случаи лептоспироза у крупного рогатого скота, в то время как в Великобритании и на Кубе имеют довольно значительное распространение, сопровождаются клиническими признаками и летальным исходом.

Заключение

По итогам обзора литературы можно сделать вывод о достаточно широком распространении и опасности таких вирусов, как ИРТ, ВД, рота- и коронавирус. Кроме вирусных агентов в нарушении воспроизводительной функции крупного рогатого скота важную роль играют лептоспиры. Профилактика данных инфекций является важным звеном в связи с тем, что все выше перечисленные инфекции у крупного рогатого скота протекают часто бессимптомно, а единственным признаком может быть аборт, агалактия или яловость коров.

Кроме того, данные литературы подчеркивают актуальность защиты молодняка крупного рогатого скота, особенно в первые дни и недели жизни.

Несмотря на достаточно большой арсенал средств специфической профилактики наиболее распространенных инфекционных болезней КРС, разработка новых безвредных биологических препаратов и совершенствование схем их применения остается актуальной.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделе контроля качества ООО «Ветбиохим», в АНО «НИИ ДПБ» и в АО ПХ «Наро-Осановский» Одинцовского района Московской области.

Штаммы вирусные и бактериальные

Вакцинные штаммы вирусов:

- штамм «Т» вируса инфекционного ринотрахеита;
- штамм «Т-04» вируса диареи;
- штамм «К-88» ротавируса крупного рогатого скота;
- штамм «КВ-90» коронавируса крупного рогатого скота.

Вакцинные штаммы лептоспир:

- «ВГНКИ-1» серологической группы *Grippotyphosa*;
- «ВГНКИ-4» серологической группы *Tarassovi*;
- «ВГНКИ-6» серологической группы *Romona*;
- «Hardjo» серологической группы *Sejroe*.

Диагностические штаммы лептоспир:

- «Romona» серологической группы *Romona*;
- «Perrelicin» серологической группы *Tarassovi*;
- «Moskwa V» серологической группы *Grippotyphosa*;
- «493 Poland» серологической группы *Sejroe*;
- «Kabura» серологической группы *Hebdomadis*;
- «M-20» серологической группы *Icterohaemorrhagiae*;
- «Hond Utrecht IV» серологической группы *Canicola*.

Все вакцинные штаммы вирусов и бактерий депонированы в государственной коллекции микроорганизмов «Всероссийского Государственного

Центра Качества и Стандартизации Лекарственных Средств для Животных и Кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Концентрат инактивированных культур лептоспир серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe с накоплением 1,8 млрд. микробных клеток в 1мл получали с ФГУП «Армавирская биофабрика» и ФГУП «Ставропольская биофабрика».

Культуры клеток и питательные среды.

Вирусы размножали в перевиваемой культуре клеток почки теленка (MDBK). В качестве ростовой среды для культур клеток использовали питательную среду Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота; поддерживающей - среду Игла MEM без сыворотки. Поддерживающие среды для рота- и коронавируса содержали трипсин в концентрации 5 мкг/мл среды. Антибиотики добавляли из расчета: пенициллина – 100 ЕД/мл и стрептомицина – 100 мкг/мл питательной среды.

Лептоспиры культивировали на сывороточной питательной среде ВГНКИ на фосфатном буфере.

Контроль стерильности проводили на мясо-пептонном агаре (МПА), мясо-пептонном бульоне (МПБ), мясо-пептонном печеночном бульоне (МППБ) и среде Сабуро согласно ГОСТ 28085.

Химические реактивы, растворы, сыворотки.

В работе использовали следующие химические реактивы:

- калий фосфорнокислый однозамещенный;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный;
- борная кислота;
- раствор аммиака;
- вода дистиллированная;
- натрий хлористый;

- спирт этиловый ректифицированный;
- пенициллин, стрептомицин;
- гель гидроокисьалюминиевый 6%-ный;
- формалин технический;
- трихлоруксусная кислота;
- едкий натр;
- соляная кислота;
- растворы трипсина и версена;
- сыворотка Fetalclone для культур клеток;
- натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280.

Оборудование:

- термостат с температурой $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $27-28^{\circ}\text{C}$ и $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$;
- водяная баня;
- ламинар;
- микроскоп инвертированный световой;
- микроскоп с конденсором темного поля;
- осветитель «ОИ-19»;
- счетная камера Петрова-Хауссера;
- торсионные весы;
- рН-метр;
- бытовой холодильник на $4-6^{\circ}\text{C}$;
- низкотемпературный холодильник (-70°C);
- центрифуга на 1000-2000 об/мин;

Лабораторная посуда и материалы.

В работе использовали следующую лабораторную посуду и материалы:

- диализная пленка;
- стеклянные бутылки вместимостью 5-6 л;

- флаконы вместимостью 50-200 мл;
- одноразовые пипетки вместимостью от 1 до 50 мл;
- шприцы одноразовые объемом 1 мл, 2 мл и 5 мл;
- планшеты полистироловые с плоским и U-образным дном;
- пипетки одноканальные и многоканальные различного объема;
- наконечники к пипеткам;
- стекла предметные и покровные;
- пробирки стеклянные.

Животные.

В работе были использованы: кролики породы шиншилла массой 3,0-3,5 кг, крольчата 5-8 суточного возраста, морские свинки массой 350-400 г, золотистые хомячки массой 45-50 г, белые мыши массой 16-18 г, крупный рогатый скот разных возрастных групп (нетели, стельные коровы, телята).

Материалом для исследований служила сыворотка крови лабораторных и продуктивных животных, в которой определяли содержание специфических антител в реакции нейтрализации (РН), реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции микроагглютинации (РМА), сыворотка крови крупного рогатого скота, в которой определяли превентивную активность по отношению к лептоспирам. Органы и ткани крольчат использовали в опытах по проведению «слепых» пассажей с целью повышения вирулентности штаммов лептоспир.

Культивирование вирусов.

Работу со штаммами вирусов проводили согласно СТО «Штаммы производственные вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиального, рота- и коронавируса крупного рогатого скота». Для чего готовили главный и рабочий посевной материал (Master seed, M.s. и Working seed, W.s.) производственных штаммов вирусов.

Процесс получения системы посевных материалов включал несколько этапов:

- приготовление культуры клеток MDBK;
- проведение пассажей вируса;
- получение вирусной суспензии;
- промежуточный контроль штамма вируса;
- лиофилизация или замораживание штамма вируса;
- контроль штамма вируса.

Для получения М.с. и W.s. производственных штаммов вирусов использовали культуру клеток MDBK, выращенную в роллерных бутылках вместимостью 1,0 л и 5,0 л. Культура клеток была свободной от вирусной, бактериальной и микоплазменной контаминации.

Посевная концентрация для роллерных бутылей составляла $2,0-3,0 \times 10^5$ клеток/мл. Срок формирования монослоя – 48-72 ч.

Перед внесением штаммов вирусов проводили контроль клеточных культур макро- и микроскопическим методами.

Заражали чистую 48-72-часовую культуру клеток MDBK с плотным клеточным монослоем, без признаков дегенерации.

Для адсорбции вируса зараженные культуры помещали в термостат с температурой $37-38^{\circ}\text{C}$ на 1 час, после чего вносили 100-300 мл поддерживающей среды Игла MEM без сыворотки (для KB, PB – с добавлением раствора трипсина - 5 мкг/мл от объема питательной среды). Зараженную вирусами и контрольную культуру клеток инкубировали при температуре $37-38^{\circ}\text{C}$ в течение 2-3 суток (для вирусов ИРТ, ВД) и 3-5 суток (для PB, KB).

Контроль интенсивности размножения вируса в культуре клеток осуществляли микроскопически путем учета цитопатического действия (ЦПД) вируса, которое проявлялось в виде округления клеток, появления в них

зернистости, полной или частичной дегенерации. Интенсивность ЦПД вируса определяли по следующим показателям и отмечали крестами:

++++ - полная дегенерация клеток (клетки отслоились от стекла и плавали в среде);

+++ - наряду с полной дегенерацией встречались отдельные живые неповрежденные клетки;

++ - встречались остатки живых неповрежденных клеток;

+ - редкие очаги дегенерации;

- - отсутствие дегенерации, клетки культуры не отличались от контрольной культуры клеток, не зараженной вирусом.

Накопление коронавируса оценивали по гемагглютинирующей активности с использованием эритроцитов белой мыши.

Инфекционный титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в \lg ТЦД_{50/мл}, КВ - в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ).

Культуры клеток, зараженные вирусами ИРТ, ВД снимали через 48-72 ч, РВ, КВ – через 72-120 ч после заражения при интенсивности цитопатического действия в три-четыре креста.

В работу брали: вирус ИРТ с инфекционной активностью не менее 7,5 \lg ТЦД_{50/мл}, ВД – не менее 7,5 \lg ТЦД_{50/мл}, РВ – не менее 7,5 \lg ТЦД_{50/мл} и КВ – не менее 6,5 \lg ТЦД_{50/мл} (1:1024 ГАЕ в РГА).

Инактивация вирусов.

Для инактивации производственной раскладки (W.s.) вирусов ИРТ, ВД, РВ и КВ использовали формалин, содержащий не менее 37% формальдегида. Время экспозиции для вируса ИРТ – 72 часа при температуре 37°C; для ВД, РВ и КВ – 24 часа при температуре 37°C.

Определение полноты инактивации вирусов.

Полноту инактивации вирусов оценивали по отсутствию их размножения в чувствительной культуре клеток MDBK в течение четырех последовательных пассажей. Для этого пробу инаktivированного вируса (5мл) диализовали против 100-кратного объема ФБР в течении 12 ч при температуре 4°C, и диализованный материал вносили в питательную среду 24-часовой культуры клеток MDBK в соотношении 1:10. На каждый пассаж использовали по 4 матраса с суточным монослоем культуры клеток, в которых перед внесением диализованной пробы вируса проводили смену ростовой среды на поддерживающую среду без сыворотки. В каждый матрас вносили по 1 мл исследуемого материала и 9 мл поддерживающей питательной среды. В матрас с культурой клеток вносили 10 мл поддерживающей среды. Инокулированные культуры инкубировали в течение 4-5 суток при температуре 36-37⁰С, проводили оценку монослоя под микроскопом, после чего культуру клеток замораживали и использовали для следующего пассажа, внося ее в соотношении 1:10 к объему поддерживающей питательной среды. Наличие вируса определяли по цитопатическому эффекту при титровании в культуре клеток MDBK, для КВ – путем постановки РГА. Отсутствие цитопатического эффекта в культуре клеток и геммагглютинирующей активности в культуральной жидкости в течение четырех последовательных пассажей свидетельствовало о полной инактивации вирусов.

Определение полноты инактивации вирусов в вакцине.

Полноту инактивации вирусов в вакцине определяли путем четырех последовательных пассажей вакцины в культуре клеток MDBK. Данную работу проводили аналогично, как и при определении полноты инактивации вирусов. Вирусы в вакцине считали инаktivированными, если они не вызывали цитопатического эффекта в культуре клеток в течение 4-х последовательных пассажей.

Культивирование лептоспир.

Лептоспиры культивировали в жидкой сывороточной питательной среде, состоящей из фосфатного буфера (рН=7,2-7,4) – 93-95 % и инактивированной сыворотки крови барана – 5-7%.

Сначала готовили маточные растворы в стеклянных флаконах. В 1 литре дистиллированной воды растворяли отдельно 9,078 г однозамещенного фосфорнокислого калия и 11,897 г двузамещенного фосфорнокислого натрия. Маточные растворы хранили при температуре 2-4°C до 30 суток.

Для получения рабочего буферного раствора брали 79 мл маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 мл однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 мл дистиллированной воды. Рабочий буферный раствор стерилизовали при температуре 120°C в течение 30 мин.

Кровь у барана для получения сыворотки крови брали из яремной вены в стерильные цилиндры вместимостью 0,5 – 1,0 л в количестве 400-500 мл. Цилиндры с кровью выдерживали при температуре 37°C в течение 30-40 мин, затем кровяной сгусток обводили металлической спицей и выдерживали в холодильнике 1-2 суток для отстаивания сыворотки. Отстоявшуюся сыворотку сливали в стерильные флаконы вместимостью 100-200 мл и инактивировали в водяной бане при температуре 56-58°C в течение часа.

Инактивированную сыворотку барана хранили при температуре 1-5 °C и использовали по мере необходимости для изготовления питательной среды.

К рабочему буферному раствору добавляли 5-7% сыворотки крови барана, готовую среду фильтровали через стерилизующие пластины марки «СФ» и расфасовывали в пробирки и флаконы.

Полученные среды проверяли на стерильность путем выдержки в термостате в течение 5 суток с последующим высевом их на МПА, МПБ, МППБ и агар Сабуро согласно ГОСТ 28085 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Штаммы лептоспир пересеивали каждые 10-15 дней. Посевная доза составляла 8-10% от объема питательной среды. Посевы культивировали при температуре 28°C в течение 7-10 дней. Наличие роста лептоспир определяли макроскопически просмотром культур в луче света от осветителя и микроскопически просмотром раздавленных капель в темном поле микроскопа. Чистоту культур проверяли высевами на МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро согласно ГОСТ 28085 и микроскопией. Хранили штаммы лептоспир при комнатной температуре в темном шкафу в течение 2-3 недель.

Серогрупповая принадлежность лептоспир.

Серогрупповую принадлежность штаммов проверяли в перекрестной реакции микроагглютинации с групповыми агглютинирующими сыворотками в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике лептоспироза животных» (1976) и Стандартом СЭВ «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза» (1980).

Полнота инактивации лептоспир.

Полноту инактивации лептоспир определяли путем посева каждого штамма на водно-сывороточную питательную среду с последующим пересеивом через 7-10 суток. Одновременно с высевами производили микроскопию методом раздавленной капли в темном поле микроскопа. Лептоспиры считали полностью инактивированными, если они не давали роста при посеве и пересеиве. Кроме того, при микроскопии лептоспиры из посева и пересеива должны быть неподвижны.

Изготовление экспериментальных серий вакцин

Изготовление экспериментальных серий вакцин проводили с учетом этиологической структуры лептоспироза, оптимального соотношения вирусного и бактериального компонентов, что изложено в соответствующих главах.

Определение стерильности.

Контроль стерильности на каждом этапе наработки штаммов и производства вакцин проводили согласно ГОСТ 28085 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Изучение стабильности готовых вакцин

Все экспериментальные вакцины хранили при температуре 2°C - 8°C в течение 18 месяцев со дня изготовления. Ежемесячно проводили визуальную оценку основных физико-химических показателей (цвет, консистенция, разбиваемость осадка).

Определение безвредности.

Безвредность экспериментальных вакцин определяли на лабораторных (белые мыши, морские свинки) и естественно-восприимчивых животных (крупный рогатый скот).

Белым мышам вакцину вводили внутривентрально в дозе 0,2 мл, морским свинкам подкожно в дозе 1,0 мл, а крупному рогатому скоту внутримышечно в дозе 4,0 мл. За животными наблюдали в течение 10 суток.

Серологические реакции.

Для обнаружения специфических антител использовали: реакцию нейтрализации (РН), реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию микроагглютинации (РМА).

Реакция нейтрализации (РН).

Реакцию нейтрализации использовали для выявления и количественной оценки специфических антител в сыворотке крови лабораторных животных и крупного рогатого скота. Сыворотку крови предварительно инактивировали в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут. РН ставили микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах (Nunc, Denmark). В лунки вносили по 0,1 мл поддерживающей среды и готовили двукратные разведения сыворотки, начиная с разведения 1:2 до 1:1024. К каждому

разведению сыворотки добавляли по 0,1 мл рабочего разведения вируса (30-300 ТЦД₅₀/100 мкл) и инкубировали в 5%-ной СО₂-атмосфере при 37 °С в течение 60 минут. Затем смесь разведений сыворотки и вируса переносили по 0,2 мл в лунки со сформированным монослоем культуры клеток и инкубировали при 37 °С в течение 4-5 суток. Для постановки РН с РВ и КВ в поддерживающую среду добавляли трипсин в концентрации 5 мкг/мл среды. Параллельно ставили контроль рабочей дозы вируса и контроль специфичности вируса. Специфичность определяли по подавлению развития ЦПД вируса гипериммунной сывороткой.

Вируснейтрализующий титр сыворотки выражали как предельное ее разведение, ингибирующее развитие ЦПД вируса в 50% зараженных культур клеток.

Реакция гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА).

Для постановки РГА и РТГА использовали эритроциты белой мыши. Кровь от животных, полученную с соблюдением правил асептики, добавляли в раствор Альсевера в соотношении 1:4 и хранили при температуре 4°С в течение 7 суток. Перед постановкой реакции эритроциты трижды отмывали фосфатно-буферным раствором (ФБР) и готовили из них 0,1%-ную суспензию.

РГА использовали для выявления и количественной оценки КВ крупного рогатого скота в вирусосодержащей культуральной жидкости. Реакцию ставили микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах с U-образным дном в объеме 0,05 мл. В лунках готовили двукратные разведения испытуемого материала на ФБР, начиная с разведения 1:2 до 1:2048. В каждую лунку добавляли 0,05 мл 0,1%-ной суспензии эритроцитов белой мыши. Планшет осторожно встряхивали и выдерживали при 4°С в течение 2-3 часов. Для контроля эритроцитов на спонтанную агглютинацию к 0,05 мл ФБР добавляли 0,05 мл суспензии эритроцитов. За титр вируса принимали наибольшее его разведение, вызывающее полную агглютинацию эритроцитов.

РТГА использовали для выявления специфических антител к КВ в сыворотке крови морских свинок и крупного рогатого скота. Перед постановкой реакции осуществляли подготовку проб сыворотки крови.

Подготовка проб сыворотки крови.

В сыворотке крови животных содержатся неспецифические ингибиторы вирусной гемагглютинации и гетероагглютинины, которые необходимо инактивировать перед постановкой РТГА. Для освобождения от термолабильных ингибиторов гемагглютинации сыворотку прогревали в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут. От термостабильных ингибиторов гемагглютинации в сыворотке освобождались каолином. Для этого к 0,2 мл инактивированной сыворотки добавляли 0,2 мл 25%-ной суспензии каолина. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч и центрифугировали 10 минут при 1500 мин⁻¹. Гетероагглютинины из сыворотки крови удаляли обработкой эритроцитами морской свинки. Для этого к 0,2 мл каждой сыворотки добавляли осадок отмытых эритроцитов в объеме 0,02 мл. Смесь выдерживали 60 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая, эритроциты осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 мин⁻¹.

РТГА ставили микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах с U-образным дном. В лунки вносили по 0,05 мл ФБР и готовили двукратные разведения исследуемой сыворотки, начиная с разведения 1:2. В каждую лунку вносили по 0,05 мл рабочего разведения вируса (4 ГАЕ) и выдерживали 60 минут при комнатной температуре. Затем во все лунки добавляли 0,1мл 0,1%-ной суспензии эритроцитов белой мыши. Планшет осторожно встряхивали и оставляли при температуре 4°C на 2-3 часа. Параллельно ставили контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию, контроль рабочей дозы вируса и

контроль специфичности вируса. Специфичность вируса определяли по подавлению его гемагглютинирующей активности гипериммунной сывороткой.

За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, полностью подавляющее гемагглютинирующую активность вируса.

Реакция микроагглютинации (РМА).

Реакцию микроагглютинации использовали для выявления в сыворотке крови специфических антител к лептоспирам различных серогрупп.

В качестве антигена в РМА использовали вакцинные или диагностические (в зависимости от вида работы) штаммы лептоспир серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe.

РМА ставили микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах с U-образным дном. Для оценки активности препаратов готовили двукратные разведения исследуемой сыворотки, начиная с разведения 1:25 до 1:6400 (в зависимости от необходимости). Для этого в первый ряд лунок вносили по 0,096 мл 0,9%-ного раствора изотонического хлорида натрия и добавляли по 0,004 мл сыворотки. В лунки второго и последующих рядов вносили по 0,05 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида изотонического. Из разведения сыворотки 1:25 после четырех-пяти кратного перемешивания вносили по 0,05 мл во второй ряд лунок. Затем после четырех-пяти кратного перемешивания вносили 0,05 мл сыворотки из второго разведения в третий ряд лунок и т. д. Из последнего ряда лунок после добавления и перемешивания сыворотки удаляли 0,05 мл. Наконечники на пипетке меняли при переходе от меньшего разведения к большему. Все разведения сыворотки вносили в четыре лунки по числу антигенов.

С целью оценки состояния хозяйства и использования РМА в качестве диагностического теста, разведения сыворотки были также двукратными, при этом титрование сыворотки начинали с разведения 1:5.

После приготовления двукратных разведений сыворотки в каждую лунку вносили по 0,05 мл штаммов лептоспир разных серогрупп (при контроле вакцины – входящих в состав вакцины).

Контролем реакции служили смесь 0,05 мл каждого штамма лептоспир с 0,05 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида изотонического, в которой лептоспиры оставались подвижными без видимых изменений морфологии, признаков агглютинации и лизиса.

Планшеты, с поставленной РМА, осторожно встряхивали, помещали в термостат и выдерживали в течение одного часа при температуре $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Реакцию учитывали путем микроскопии капель из каждого разведения на предметных стеклах под микроскопом с конденсором «темного поля», используя окуляр 10х, бинокулярную насадку 1,5х и объектив 20х. При этом суммарное увеличение составляло 300х. Реакцию оценивали в крестах по четырехбалльной системе:

- четыре креста – агглютинированы 100% лептоспир;
- три креста – агглютинированы 75% лептоспир;
- два креста – агглютинированы 50% лептоспир;
- один крест – агглютинированы 25% лептоспир;
- минус – агглютинация отсутствует.

За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, в котором агглютинировало не менее 50% лептоспир в поле зрения. При этом в контрольных лунках было не менее 60-70 подвижных, не агглютинированных лептоспир.

Вирулентность штаммов лептоспир.

Вирулентность лептоспир определяли по величине 50%-ной летальной дозы (LD_{50}) для золотистых хомячков, выраженной количеством микробных клеток. С целью определения LD_{50} четырехнедельных хомячков массой 45-50 г заражали внутрибрюшинно пятидневной культурой лептоспир в последовательно

убывающих дозах с шагом 5 или 10, используя по 4-6 хомячков на каждую дозу лептоспир.

Концентрацию микробных клеток определяли в счетной камере Петрова-Хауссера.

Расчет LD₅₀ проводили по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Вирулентные свойства штаммов, при необходимости, восстанавливали путем проведения n-кратных «слепых» пассажей исходных штаммов через золотистых хомячков. О повышении вирулентности штамма судили по гибели зверьков, зараженных патологическим материалом, полученным в результате каждого пассажа. После последнего пассажа делали микроскопию и высевы из сердца и печени павших зверьков с целью получения чистой культуры лептоспир, у которой определяли 50%-ную летальную дозу.

Вирулентные штаммы лептоспир после контроля стерильности и учета накопления хранили запаянными в ампулах в низкотемпературном холодильнике (минус 60-70⁰С).

Определение превентивной активности сыворотки крови.

Превентивные свойства сыворотки крови иммунизированных животных определяли путем внутримышечного введения по 0,5 мл исследуемой сыворотки 10 золотистым хомячкам массой 45-50 г. Через 2 часа животных заражали внутрибрюшинно 10 LD₅₀ вирулентного штамма лептоспир. Контролем вирулентности лептоспир служили зараженные хомячки, не обработанные сывороткой крови. Результаты опыта учитывали через 10 дней после гибели контрольных животных.

При этом считали, что вакцинированный крупный рогатый скот защищен от инфицирования лептоспирами до тех пор, пока сыворотка крови животных предохраняет от гибели не менее 40% хомячков, зараженных смертельной дозой лептоспир (Ю.А. Малахов, В.С. Соловьева, 1977).

Статистическая обработка результатов.

При анализе и статистической обработке результатов расчета средней геометрической, критерия достоверности использовали программы Microsoft Office Excel 2003, Stat Plus 2005.

При этом приняты следующие обозначения:

n – число наблюдений или животных в опыте;

P – критерий достоверности.

Значения критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала.

Вероятность различий считалась существенной при $P < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Распространенность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота в РФ.

Распространенность и этиологическая структура лептоспироза изучаются во всех странах мира с целью:

- установить широту циркуляции возбудителей лептоспироза на тех или иных территориях;
- установить соответствие этиологической структуры лептоспироза составу средств специфической профилактики;
- своевременного выявления новых сероваров и серогрупп лептоспир в связи с трансграничными перевозками животных;
- проследить наличие эпизоотических и эпидемических связей.

По данным литературы, являясь достаточно стабильной, этиологическая структура лептоспироза у животных разных видов, тем не менее, подвержена серьезным изменениям. Наиболее существенные изменения отмечают в Российской Федерации в этиологической структуре лептоспироза свиней и собак [80, 57].

В этой связи одним из первых этапов нашей работы было изучение распространенности и этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации.

Нами подвергнуты статистической обработке данные отчетности областных, краевых, республиканских лабораторий всех регионов Российской Федерации о проведенных исследованиях на лептоспироз крупного рогатого скота за период с 1996 по 2011 гг. Сводные данные по инфицированности и этиологической структуре лептоспироза животных за 16 лет по регионам РФ, а также динамика этих показателей по годам представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Инфицированность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота по регионам РФ за 1996-2011 гг

Регион	Кол-во исслед-х животных	Инфицированность (РМА, %)	в т. ч. положительных реакций с лептоспирами серогрупп, %							
			Ictero-haemorrhagiae	Canicola	Grippyphosa	Hebdomadis	Sejroe	Pomona	Tarasovi	Смешанные
Сев.-Запад.	613534	27,9	9,1	2,8	9,8	14,6	25,2	6,8	1,7	30,0
Центр.	1961687	29,9	3,3	0,7	8,4	14,1	15,0	4,7	3,8	50,0
Приволж.	2456374	22,0	2,3	0,8	6,3	25,8	24,4	4,4	11,7	24,3
Южный	1766418	5,9	9,3	3,6	5,3	26,4	18,6	12,2	8,8	15,8
Уральский	593897	32,6	5,1	1,3	6,5	10,9	24,2	8,6	5,2	38,2
Сибирский	1872307	11,3	4,2	1,0	3,8	35,2	24,5	5,0	9,4	16,9
Дальнев.	214299	8,5	1,8	0,6	15,3	24,4	15,8	2,5	3,8	35,8
ИТОГО	9478516	19,3	4,2	1,2	7,1	20,5	21,0	5,7	7,0	33,3

Таблица 3

Динамика распространенности и этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота в России за 1996-2011 гг

Год	Кол-во исслед-х животных	Инфицированность (РМА,%)	в т. ч. положительных реакций с лептоспирами серогрупп, %							
			Ictero-haemorrhagiae	Canicola	Grippyphosa	Hebdomadis	Sejroe	Pomona	Tarasovi	Смешанные
1996	626814	25,1	1,7	0,3	6,1	29,9	31,1	4,6	6,4	19,9
1997	610848	24,8	1,8	0,8	5,2	25,6	27,8	5,1	8,5	25,2
1998	626495	24,4	1,5	0,4	4,7	22,4	26,8	3,9	7,0	33,3
1999	618891	24,6	2,3	0,4	5,8	26,3	21,3	4,2	6,6	33,1
2000	613778	24,7	2,5	0,5	5,3	30,8	21,6	4,5	8,1	26,7
2001	652057	23,4	2,9	0,4	6,0	23,2	19,8	4,7	9,0	34,0
2002	484243	20,6	3,2	0,7	7,3	28,8	16,2	5,0	6,7	32,1
2003	562777	18,9	0,3	0,3	5,5	12,9	17,5	6,0	8,7	48,8
2004	536844	18,6	3,8	0,4	7,5	17,7	18,2	7,6	8,6	36,2
2005	528636	19,9	10,2	5,9	12,9	7,2	15,0	5,1	7,3	36,4
2006	591867	19,1	8,2	5,4	12,9	7,7	24,0	7,4	0,5	33,9
2007	450089	17,4	14,4	0,6	9,8	8,5	13,4	5,2	4,8	43,3
2008	588989	15,8	5,8	0,8	7,7	12,0	20,5	6,8	7,0	39,4
2009	651105	13,0	4,5	0,7	6,6	13,3	15,7	8,6	6,6	44,0
2010	655797	10,5	4,8	1,3	7,7	11,7	14,6	9,6	7,7	42,6
2011	679286	9,4	4,3	1,0	6,6	11,6	14,1	8,6	7,2	46,6
ИТОГО	9478516	19,3	4,2	1,2	7,1	20,5	21,0	5,7	7,0	33,3

За 16 лет обследовано на лептоспироз серологическим методом по России почти 9,5 млн. крупного рогатого скота. В среднем инфицированность составляла 19,3%. В динамике по годам в период с 1996 по 2001 гг. инфицированность

составляла 23-25%. К 2011 г. наметилась четкая тенденция к снижению распространенности лептоспироза КРС, инфицированность с 20,6% в 2002г снизилась соответственно до 9,4%.

В этиологической структуре лептоспироза КРС в РФ максимальное количество положительных реакций приходится на лептоспиры серологических групп *Sejroe* (21,0%) и *Hebdomadis* (20,5%). На долю лептоспир *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona* приходится соответственно 7,1%, 7,0% и 5,7%. По отдельным регионам количество положительных реакций с лептоспирами данных серогрупп может варьировать, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

В динамике по годам отмечалось снижение количества положительных реакций с лептоспирами *Sejroe* и *Hebdomadis* соответственно в 1996 г. с 31,1% и 29,9% до 14,4% и 11,6% в 2011 г., но при этом увеличивалось количество смешанных реакций с данными лептоспирами с 19,9% до 46,6%. Отмечается тенденция к увеличению положительных реакций с лептоспирами серогруппы *Romona* с 4,6% до 8,6%. Достаточно существенные колебания отмечены с лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, количество положительных реакций увеличилось с 1,7% (1996 г) до 4,3% (2011 г), максимальное количество положительных реакций – 14,4% отмечено в 2007г. Такие всплески положительных реакций могут быть связаны, по нашему мнению, во-первых, с увеличением численности серых крыс, основного резервуара данного возбудителя, особенно в Северо-Западном и Южном регионах, а во-вторых, с поступлением инфицированных животных на территорию РФ, как из сопредельных регионов, так и дальнего зарубежья.

Из данных таблиц видно, что наиболее часто у КРС обнаруживались антитела в РМА к лептоспирам серогрупп *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona*. Достаточно большой процент животных имели антитела

одновременно к лептоспирам двух или более серогрупп, в связи с чем целесообразно включать в состав комбинированных вакцин штаммы лептоспир нескольких серогрупп.

Анализ полученных результатов еще раз подтвердил достаточную стабильность этиологической структуры лептоспироза КРС в Российской Федерации в данных экономических условиях. Было принято решение оставить в составе новых вакцин лептоспиры серогрупп *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona*. Вопрос включения в состав вакцин лептоспир серогруппы *Icterohaemorrhagiae* мы посчитали преждевременным, однако, по всей вероятности, это дело времени. С целью последующего его решения необходимо проводить постоянный мониторинг за изменениями этиологической структуры лептоспироза и использование бактериологической диагностики.

3.2 Разработка состава вакцин, технологической схемы и оптимального соотношения компонентов.

Создание крупных животноводческих хозяйств, решающих проблему обеспечения населения продуктами питания, имеет не только положительные стороны, но в отношении эпизоотического благополучия животноводческих хозяйств и отрицательные. Это связано с возможностью распространения инфекционных болезней, как вирусных, так и бактериальных с охватом значительного поголовья животных.

С целью профилактики инфекционных болезней, недопущения осложнения эпизоотической ситуации в хозяйствах предпочтительнее использовать для вакцинации животных ассоциированные вакцины, позволяющие в минимально короткие сроки создавать невосприимчивость поголовья одновременно к нескольким инфекциям.

С целью разработки ассоциированных вакцин необходимо решить несколько вопросов, таких как:

- широта распространенности тех или иных инфекционных агентов в хозяйстве и оптимизация состава вакцинных препаратов;
- разработка технологической схемы производства препаратов;
- установление оптимальных соотношений антигенов в вакцине с целью устранения явления интерференции, что явилось задачей исследований данного раздела.

3.2.1 Оптимизация состава вакцинных препаратов

С 1996г выпускается вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота «КОМБОВАК» (В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер, патент РФ на изобретение №2261111, 2004), обеспечивающая специфическую

профилактику наиболее значимых вирусных болезней крупного рогатого скота.

По данным ряда авторов наиболее опасными и широко распространенными вирусными агентами у взрослого крупного рогатого скота являются вирусы инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи, а для молодняка крупного рогатого скота – рота- и коронавирусы. Количество серопозитивных животных составило в среднем 57,3% к вирусу ИРТ и 61,6% к вирусу ВД. Более чем в 60% хозяйств были обнаружены антитела как к вирусу ИРТ, так и к вирусу ВД. При этом у 76,8% животных в сыворотке крови одновременно присутствовали антитела к обоим вирусам (цитировано по А.Е. Верховской, 2008). На основе данных литературы и собственных исследований были созданы и успешно применяются вакцины КОМБОВАК-К и КОМБОВАК-Р для специфической профилактики инфекционных болезней желудочно-кишечного и респираторного трактов [14].

Перед началом работ в хозяйстве АО ПХ «Наро-Осановский» нами был проведен мониторинг наличия титров антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ, а также к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa и Sejroe в соответствующих реакциях. Полученные результаты представлены в таблице 4 и 5.

Таблица 4

Мониторинг наличия титров антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ
в хозяйстве до проведения опыта

Название молочно-товарной фермы (МТФ)	Всего исследовано проб	Количество положительных проб к вирусам:			
		ИРТ	ВД	РВ	КВ
«Молочный комплекс»	380	276	342	380	380
«Еремино»	350	202	315	214	246
Итого	730	478	657	594	626
Итого, % положит. проб		65,5	90,0	81,4	85,8

Таблица 5

**Мониторинг наличия титров антител к лептоспирам
в хозяйстве до проведения опыта**

Название молочно-товарной фермы (МТФ)	Всего		Положительных проб к лептоспирам серогрупп, %:			
	исследовано проб	положительных реакций %	Romona	Tarassovi	Grippotyphosa	Sejroe
«Молочный комплекс»	380	77,1	50,2	8,2	10,2	31,4
«Еремино»	350	54,3	42,6	15,8	7,9	33,7
Итого	730	66,2	47,2	11,2	9,3	32,3

Из данных, представленных в таблице 4 и 5, следует, что в хозяйстве на двух фермах исследовано серологическими методами 730 голов крупного рогатого скота. Вируснейтрализующие антитела к вирусу ИРТ были обнаружены у 65,5%, к вирусу ВД – у 90,0%, к ротавирусу – у 81,4%, к коронавирусу – у 85,8% животных.

Антитела к лептоспирам обнаруживали у 66,2% животных, у большинства животных титр был ниже диагностического, т.е. ниже 1:50. Тем не менее, при расчете инфицированности мы учитывали этих животных, как имевших контакт с возбудителями лептоспироза ранее. Этиологическая структура лептоспироза была представлена следующим образом: на долю лептоспир серогруппы Romona приходилось 47,2 % положительных реакций, Tarassovi – 11,2%, Grippotyphosa – 9,3%, Sejroe – 32,3%.

По неопубликованным данным Верховского О.А., Баландиной М.В., Латышева О.Е., Елакова А.Л. (АНО «НИИ ДПБ»), представленным в таблице 6 и 7, циркуляция вирусов ИРТ, ВД, РВ и КВ в различных регионах Российской Федерации и по сей день остается довольно существенной. Это подтверждает необходимость постоянного мониторинга за инфицированностью животных и совершенствование средств специфической профилактики.

Таблица 6

Мониторинг распространенности вирусов ИРТ, ВД, рота- и коронавируса
в регионах РФ в 2015 г. (по результатам РН)

Регион	Результаты исследований							
	ИРТ		ВД		РВ		КВ	
	всего	« + »	всего	« + »	всего	« + »	всего	« + »
Брянская обл.	6	5	6	3	6	3	6	6
Вологодская обл.	12	6	12	3	12	7	12	7
Волгоградская обл.	17	7	17	9	17	4	17	6
Воронежская обл.	41	7	41	28	36	17	36	33
Калужская обл.	20	8	20	8	10	9	10	5
Костромская обл.	5	0	5	4	5	3	5	4
Краснодарский край	33	15	33	12	30	20	30	28
Московская обл.	165	100	168	117	102	69	102	78
Нижегородская обл.	42	19	42	21	40	33	40	33
Республика Башкортостан	12	3	12	3	6	6	6	6
Республика Марий Эл	10	2	10	4	10	9	10	8
Рязанская обл.	15	6	15	4	15	11	15	15
Ставропольский край	33	12	33	12	25	18	25	25
Ярославская обл.	14	8	14	14	14	11	14	12
Итого	425	198	428	242	328	220	328	266
Итого,% полож. проб	46,6		56,5		67,1		81,1	

« + » - количество положительных проб

Таблица 7

Мониторинг распространенности вирусов ИРТ, ВД, рота- и коронавируса
в регионах РФ в 2015 г. (по результатам ПЦР)

Регион	Результаты исследований							
	ИРТ		ВД		РВ		КВ	
	всего	«+»	всего	«+»	всего	«+»	всего	«+»
Брянская обл.	19	0	19	0	н/и	н/и	н/и	н/и
Вологодская обл.	41	8	41	13	5	1	12	5
Волгоградская обл.	12	4	12	0	н/и	н/и	н/и	н/и
Воронежская обл.	75	0	75	15	21	0	21	3
Калужская обл.	9	0	9	2	н/и	н/и	н/и	н/и
Костромская обл.	9	6	9	0	5	0	5	0
Краснодарский край	46	4	46	0	8	0	12	0
Московская обл.	282	22	768	78	21	3	33	4
Нижегородская обл.	41	7	41	0	3	0	5	2
Республика Марий Эл	23	1	23	0	н/и	н/и	8	2
Рязанская обл.	9	0	9	0	н/и	н/и	н/и	н/и
Смоленская обл.	12	0	12	0	5	0	5	1
Ставропольский край	45	7	45	2	н/и	н/и	н/и	н/и
Ярославская обл.	27	0	27	7	4	0	4	0
Итого	650	59	1136	117	72	4	105	17
Итого,% полож. проб	9,1		10,3		5,6		16,2	

Примечание: «+» - количество положительных проб; н/и – исследования не проводили

По различным регионам РФ методом постановки РН антитела к вирусу ИРТ обнаруживали у 46,6%, к вирусу ВД – у 56,5%, к ротавирусу – у 67,1%, к коронавирусу – у 81,1% животных.

Методом ПЦР максимальное количество положительных находок приходилось на обнаружение ДНК коронавируса (16,2%), далее РНК вируса ВД (10,3%), ДНК вируса ИРТ (9,1%) и ротавируса (5,6%) крупного рогатого скота.

Анализ литературных данных и собственных наблюдений в хозяйствах позволил нам сделать заключение, что наибольшую распространенность в РФ среди крупного рогатого скота имеют вирусы ИРТ, ВД, рота- и коронавируса. Из бактериальных агентов наиболее убиквитарными явились, по нашему мнению, лептоспиры. Одним из клинических признаков, а иногда и единственным, объединяющим этих возбудителей в одну группу, является аборт, иногда мертворождение, рождение телят вирусо- и лептоспиросителей. Значительный период времени, необходимый для постановки диагноза, не способствует улучшению эпизоотической (в отношении лептоспироза и эпидемической) ситуации. В этой связи мы пришли к необходимости создания вакцин против:

- инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, а также лептоспироза, вызываемого лептоспирами серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe;
- инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза (Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe), которые могут быть использованы для предупреждения инфекционных болезней крупного рогатого скота, сопровождающихся нарушением функций репродуктивной системы различной степени тяжести и создания колострального иммунитета у молодняка.

Предварительно определив состав вакцин, мы дали им рабочие названия: КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л (КОМ- комбинированные, БО- крупный рогатый скот, ВАК- вакцина, 2, 4- количество вирусных антигенов, Л-

лептоспиры).

3.2.2 Разработка технологической схемы изготовления и оптимального соотношения компонентов инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л

В процессе изготовления вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л ряд технологических моментов был известным. Так вирусные компоненты вакцин готовили согласно технологического регламента на вакцину КОМБОВАК. Лептоспирозный компонент готовили согласно технологического регламента на концентрированную вакцину против лептоспироза животных.

Главным составляющим звеном технологического регламента является работа с производственными штаммами.

Основными этапами изготовления производственных штаммов вирусов были:

- приготовление питательных сред;
- приготовление и контроль вирусных расплодок M.s и W.s;
- выращивание культуры клеток;
- заражение клеточного монослоя вирусами;
- сбор вирусного материала и получение вирусосодержащих суспензий;
- отбор проб и промежуточный контроль вирусного сырья (инфекционная активность, стерильность);
- инаktivация вирусного сырья;
- контроль полноты инаktivации вирусов.

Основными технологическими этапами изготовления производственных штаммов лептоспир являлись:

- приготовление солевых растворов и питательной среды для культивирования лептоспир;
- приготовление матричных расплодок лептоспир серологических групп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa и Sejroe;

- контроль морфологии, накопления, стерильности, формы колоний (отсутствие диссоциации) и серогрупповой принадлежности лептоспир;
- приготовление производственных расплодок лептоспир данных серогрупп;
- контроль морфологии, накопления и стерильности производственных расплодок лептоспир;
- объединение производственных расплодок;
- консервирование формалином, содержащим не менее 37% формальдегида до конечной концентрации в среде 0,15%;
- общий учет накопления лептоспир и полноты инактивации;
- концентрирование лептоспир в 25-30 раз методом ультрафильтрации;
- учет количества лептоспир в концентрированной культуре и контроль стерильности производственной расплодки.

Процесс смешивания вирусных компонентов между собой и соединение их с бактериальным был достаточно сложным.

Вакцина КОМБОВАК 2+Л

Вирусные компоненты смешивали в вакцине КОМБОВАК 2+Л в соотношении 1:1, 2:1, 1:2, к которым добавляли стандартное количество микробных клеток лептоспир, в том числе варьируя их объемом и объемом гидроокиси алюминия, используемой в качестве адьюванта. Состав вакцины КОМБОВАК 2+Л представлен в таблице 8.

Таблица 8

Композиционный состав инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л)

Компонент	Титр, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Содержание компонентов, об. %			
		Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Вирус ИРТ	7,5-8,0	-	-	40	-
	8,0-8,5	30	-	-	30
	8,5-9,0	-	20	-	-
Вирус ВД	7,5-8,0	-	40	-	-
	8,0-8,5	30	-	20	30
Лептоспиры	-	20	20	20	10
ГОА (6%-й гель)	-	20	20	20	30

Оценить правильность выбора количественного состава компонентов вакцины представляется возможным только по антигенной активности препарата на чувствительной лабораторной модели.

Антигенную активность вирусных компонентов (вирус ИРТ и ВД) определяли в опыте на морских свинках, лептоспир – на кроликах. Животных формировали в группы по принципу аналогов, используя по 10 морских свинок и 5 кроликов на каждый вариант вакцины. Морским свинкам вакцину вводили однократно подкожно в дозе 0,5 мл, кроликам однократно внутривенно из расчета в дозе 15 млн микробных клеток лептоспир каждой серогруппы. В качестве контроля использовали не вакцинированных животных.

Кровь у вакцинированных животных брали через 21 день и сыворотку крови исследовали в соответствующих серологических реакциях – к вирусам ИРТ и ВД – в реакции нейтрализации (РН), к лептоспирам – в реакции микроагглютинации (РМА). Результаты исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9

Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 2+Л с разным количественным составом компонентов в опыте на лабораторных животных

Вариант вакцины	Титр антител в сыворотке крови экспериментальных животных к*					
	вирусам		лептоспирам серогрупп			
	ИРТ	ВД	Pomona	Tarassovi	Grippotyphosa	Sejroe
1	64,2±8,7	124,0±12,5	1580±213	1428±125	1243±112	1415±132
2	73,3±12,2	132,0±14,2	1562±189	1516±194	1325±124	1495±130
3	68,8±10,1	118,0±8,9	1623±209	1813±202	1301±118	1501±182
4	52,0±8,4	74,0±15,8	1468±174	1315±116	1021±106	1101±112
контроль	-	-	-	-	-	-

Примечание: * - здесь и далее в таблицах и рисунках титры антител приведены в обратных величинах.

Таким образом, все представленные варианты препарата обладали высокой антигенной активностью, как к вирусному компоненту (вирусы ИРТ и ВД), так и к лептоспирам разных серогрупп. Антигенная активность первых трех вариантов вакцины была практически одинаковой в отношении всех компонентов. У четвертого варианта вакцины антигенная активность была ниже, как к вирусному компоненту, так и к бактериальному, что мы связываем с увеличением гидрата окиси алюминия до 30%, что, возможно, является следствием переизбыточного его содержания при высокой концентрации сывороточного белка среды в концентрате лептоспир. Оптимальной концентрацией гидрата окиси алюминия в вакцине считали 20%.

Вакцина КОМБОВАК 4+Л

В вакцине КОМБОВАК 4+Л вирусный и лептоспирозный компоненты смешивали с таким расчетом, чтобы концентрация вирусных антигенов в готовой вакцине составляла не менее 6,5 lg ТЦД₅₀, лептоспир – не менее 270 млн микробных клеток/мл.

Полученные варианты инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота имели компонентный состав, приведенный

в таблице 10.

Таблица 10

Композиционный состав инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л)

Компонент	Титр, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Содержание компонентов, об.%		
		Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3
Вирус ИРТ	7,5-8,5	15	20	-
	8,5-9,0	-	-	10
Вирус ВД	7,5-8,5	15	20	-
	8,5-9,0	-	-	10
Ротавирус	7,5-8,0	-	-	20
	8,0-8,5	15	10	-
Коронавирус	6,5-7,0	-	-	20
	7,0-7,5	15	10	-
Лептоспиры	-	20	20	10
ГОА (6%-й гель)	-	20	20	30

Критерием оценки компонентного состава вакцины, как и в предыдущем опыте, служила антигенная активность препарата в опыте на морских свинках и кроликах. Формировали группы животных-аналогов – морских свинок по 10 голов, кроликов по 5 в каждой. Морским свинкам вакцину вводили однократно подкожно в дозе по 0,5 мл, кроликам однократно внутривенно из расчета 15 млн микробных клеток лептоспир каждой серогруппы в дозе. В качестве контроля использовали не вакцинированных животных.

Кровь брали через 21 день после вакцинации, полученную сыворотку крови исследовали в соответствующих серологических реакциях – к вирусам ИРТ, ВД, РВ – в РН, к КВ – в РТГА, к лептоспирам – в РМА. Результаты исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11

**Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 4+Л разного состава
в опыте на лабораторных животных**

Вариант вакцины	Титр антител в сыворотке крови морских свинок к вирусам:				Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам
	ИРТ	ВД	РВ	КВ	
1	68,0±5,4	110,2±8,8	112,0±13,4	84,0±8,6	1632±142
2	85,4±10,2	134,0±12,5	128,0±15,9	108,4±10,2	2032±196
3	64,5±8,3	105,2±10,3	92,0±10,4	98,2±15,1	1424±148
контроль	-	-	-	-	-

Также как и в предыдущем опыте с вакциной КОМБОВАК 2+Л, антигенная активность препарата КОМБОВАК 4+Л была достаточно высокой по отношению ко всем компонентам.

На основании полученных данных был сделан вывод об отсутствии интерференции между вирусными (вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ) и бактериальным (лептоспиры) компонентами в составе данных ассоциаций. Оптимальной концентрацией гидрата окиси алюминия в вакцине считали 20%.

Таким образом, была подобрана схема изготовления вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, правильность ее показана путем изучения антигенной активности на чувствительных лабораторных моделях. В состав вакцины КОМБОВАК 2+Л вошли производственные штаммы вирусов ИРТ, ВД и лептоспиры серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa* и *Sejroe*. В состав вакцины КОМБОВАК 4+Л вошли производственные штаммы вирусов ИРТ, ВД, РВ, КВ и производственные штаммы лептоспир серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa* и *Sejroe*. Оптимальное количество адьюванта в обоих препаратах составляло 20%.

После разработки вакцин были внесены изменения в Технологический регламент на вакцины «КОМБОВАК».

3.3 Изготовление и методы биологического контроля вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л

В предыдущих опытах был определен оптимальный состав вакцин для специфической профилактики нарушений функции воспроизводства у крупного рогатого скота и некоторые технологические аспекты их изготовления.

Однако остался открытым вопрос методов контроля биологической активности препаратов, позволяющих дать оценку качества вакцин, показать стабильность и воспроизводимость получаемых результатов, что и явилось задачей данного раздела.

Для выполнения поставленной задачи изготовили по 3 серии инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л.

Все серии вакцин проверяли на стерильность, безвредность, а также полноту инактивации вирусов. Стерильность определяли по ГОСТ путем высева на МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро. Полноту инактивации вирусов в вакцине определяли путем проведения четырех последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток MDBK. Полноту инактивации лептоспир определяли микроскопией и посевами на питательные среды для культивирования лептоспир. Безвредность вакцин проверяли на белых мышах и морских свинках. Морским свинкам (n=5) вакцину вводили подкожно в дозе 1,0 мл, белым мышам (n=10) внутрибрюшинно в дозе 0,2 мл. За животными наблюдали в течение 10 суток. Опытные образцы вакцин были стерильными, безвредными, не вызывали местных реакций и все животные оставались клинически здоровыми в течение срока наблюдения. Вирусы и лептоспиры в вакцине были полностью инактивированы.

Антигенная активность является одним из критериев оценки препаратов и залогом их будущей эффективности на естественно-восприимчивых животных.

Антигенную активность экспериментальных вакцин проводили на кроликах и морских свинках. Кроликов традиционно использовали в качестве модели при контроле активности лептоспирозного компонента, морских свинок – при контроле активности вирусных компонентов. Морских свинок, сформированных в группы по принципу аналогов (n=10 в каждой группе), иммунизировали изготовленными сериями вакцин подкожно однократно в дозе 0,25 мл, 0,5 мл и 1,0 мл, а кроликов (n=5) однократно внутривенно по 0,3 мл. В качестве контроля использовали чистых животных и животных, вакцинированных поливалентной вакциной ВГНКИ против лептоспироза животных (кролики) и вакциной инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота «КОМБОВАК» (морские свинки), приготовленных нами из того же сырья по технологии коммерческих препаратов. Введение контрольных образцов вакцин животным осуществляли в дозах и способами, предусмотренными соответствующими нормативными документами. Взятие крови проводили на 21-е сутки после инъекции вакцин. Сыворотку крови морских свинок исследовали в РН (к КВ – РТГА), кроликов - в РМА. Кроме того, сыворотку крови кроликов исследовали по превентивной активности для золотистых хомячков, зараженных вирулентным штаммом лептоспир. Полученные результаты приведены в таблице 12 и 13.

Таблица 12

Антигенная активность вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л) на экспериментальных моделях

Номер серии	Антигенная активность вирусного компонента на морских свинках		Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам	Превентивная активность сыворотки крови кроликов к лептоспирам, %	
	Доза препарата, мл	Титр вируснейтрализующих антител к вирусам, М±m			
		ИРТ			ВД
1	0,25	29,4±7,2	72,8±8,2	1024±268	90
2	0,5	84,6±6,4**	116,8±14,5**	1600±190**	100
3	1,0	60,5±5,8	90,5±9,4	1393±185	100
ВГНКИ	0,75	-	-	1838±202	100
Комбовак	1,0	89,8±6,2	110,5±15,4	-	-
контроль	-	0	0	0	0

Примечание: ** - здесь и далее в таблицах статистическая достоверность различий по отношению к контрольной группе, $P < 0,05$.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что доза 0,25 мл является недостаточной для образования антител к вирусу ИРТ и ВД. Дозы 0,5 мл и 1,0 мл вызывают образование антител, примерно на одном уровне. Использование дозы 1,0 мл, по нашему, мнению, нецелесообразно, так как приводит к перенасыщению организма животных антигенами.

По отношению к лептоспирам у всех трех серий препарата отмечали достаточно высокий титр антител в сыворотке крови кроликов и, кроме того высокий уровень превентивной активности.

В данных опытах еще раз подтверждена концепция, что при контроле вакцин против лептоспироза кролику следует вводить не менее 15-20 млн микробных клеток лептоспир каждой серогруппы [72]. На этом основан контроль вакцин, содержащих лептоспирозный компонент. Превышение концентрации лептоспир перенасыщает организм кролика антителами и не позволяет дифференцировать серии препаратов с недостаточной активностью.

Таблица 13

Антигенная активность комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л) на экспериментальных моделях

Номер серии	Антигенная активность вирусного компонента на морских свинках				Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам	Превентивная активность сыворотки крови кроликов к лептоспирам, %	
	Доза препарата, мл	Титр вируснейтрализующих антител к вирусам, М±m					
		ИРТ	ВД	РВ			КВ
1	0,25	38,6±7,2	68,4±9,0	72,4±14,5	68,2±9,4	1436±152	90
2	0,5	89,5±9,4**	126,6±15,8**	140,2±20,5**	106,5±14,8**	1783±208**	100
3	1,0	72,4±5,8	102,5±10,4	110,4±16,5	94,2±13,4	1642±176	90
ВГНКИ	0,75	-	-	-	-	1887±246	100
Комбовак	1,0	94,6±12,2	124,5±14,8	135,5±17,2	108,4±15,6	-	-
контроль	-	0	0	0	0	0	0

Из данных таблицы видно, что, как и в предыдущем опыте, все экспериментальные животные отвечали образованием антител на введение разных серий препарата, а по отношению к вирусному компоненту – и разных доз. Оптимальные результаты, по нашему мнению, получены при введении вакцины морским свинкам в дозе 0,5 мл. Результаты по лептоспирозному компоненту аналогичны таковым в вакцине КОМБОВАК 2+Л.

Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что предложенный метод контроля антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, основанный на однократной вакцинации морских свинок и кроликов в предложенных дозах и предложенным способом, с последующим взятием крови и исследовании ее в соответствующих серологических реакциях, позволяет получить стабильный гуморальный иммунный ответ у животных, что отражает антигенную активность изучаемых препаратов как к вирусным, так и к бактериальному компонентам. Результаты являются достоверными и воспроизводимыми. Метод контроля антигенной активности заложен в разработанное с нашим участием СТО «Вакцины инактивированные против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-

синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота (КОМБОВАК)».

3.4 Контроль антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения

При разработке и внедрении в практику новых средств специфической профилактики необходимым условием, помимо безвредности, является сохранность ими антигенных и иммуногенных свойств в течение всего срока годности, что и обеспечивает эффективность применения этих препаратов.

Задачей данного раздела было изучение антигенной и иммуногенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения. Кроме того, выполнение этой работы позволило установить срок годности вакцин.

Для решения поставленной задачи, приготовленные и проверенные по всем показателям (безвредность, антигенная и иммуногенная активность) образцы опытных серий вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л хранили в течение 24 месяцев при температуре 2⁰С – 8⁰С. Ежемесячно проводили визуальный контроль вакцин на предмет регистрации изменений внешнего вида и разбиваемости осадка.

Антигенную активность испытуемых вакцин определяли сразу после изготовления и в процессе хранения образцов в динамике через каждые 6 месяцев по уровню антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных, в качестве которых использовали морских свинок и кроликов. Морских свинок (n=5) иммунизировали испытуемыми образцами вакцин с разным сроком хранения однократно подкожно в дозе 0,5 мл. Через 21 сутки у животных брали кровь и полученную сыворотку крови исследовали в РН на наличие вируснейтрализующих антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и в РТГА к КВ. Кроликов (n=5) иммунизировали теми же образцами вакцин однократно внутривенно в дозе 0,3 мл. Сыворотку крови кроликов получали через 21 сутки после вакцинации и исследовали ее на наличие антител к лептоспирам четырех, входящих в состав вакцины, серогрупп лептоспир в реакции микроагглютинации. Полученные результаты приведены в таблице 14 и 15.

Таблица 14

Антигенная активность вирусных компонентов вакцин
КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения

Вакцина	Средний титр антител по группе, $M \pm m$					
	к вирусу	срок хранения вакцины при $2^{\circ}\text{C}-8^{\circ}\text{C}$				
		при изготовлении	6 мес	12 мес	18 мес	24 мес
КОМБОВАК 2+Л	ИРТ	79,8±6,2	82,4±4,6	68,4±5,3	44,6±9,2	16,2±6,9
	ВД	114,1±12,6	110,8±9,7	94,6±3,2	73,2±10,5	40,5±10,2
КОМБОВАК 4+Л	ИТР	84,5±8,1	86,2±10,8	82,4±13,2	78,6±9,4	22,6±8,2
	ВД	122,2±18,1	136,5±6,7	120,4±14,6	96,0±5,8	42,6±12,4
	РВ	142,2±22,4	135,5±17,3	112,6±9,2	98,4±7,4	52,8±14,3
	КВ	104,2±13,6	102,5±14,5	105,2±13,2	96,0±8,2	38,4±6,9

Таблица 15

Антигенная активность бактериального компонента вакцин
КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения

Вакцина	Средний титр антител по группе, $M \pm m$					
	к лептоспирам серогрупп	срок хранения вакцины при $2^{\circ}\text{C}-8^{\circ}\text{C}$				
		при изготовлении	6 мес	12 мес	18 мес	24 мес
КОМБОВАК 2+Л	Pomona	2425±312	2340±304	1744±116	1135±124	528±46
	Tarassovi	2786±346	2560±326	2111±248	1813±262	696±74
	Grippotyphosa	1838±202	1531±228	1554±218	1600±190	960±92
	Sejroe	1393±185	1135±124	960±92	960±92	528±42
КОМБОВАК 4+Л	Pomona	1838±202	1744±116	1618±140	960±92	696±74
	Tarassovi	1213±110	2063±204	2560±326	1375±180	1135±124
	Grippotyphosa	2111±248	2340±304	2400±308	1213±110	303±64
	Sejroe	1393±185	1135±124	1702±112	1558±216	528±46

Из приведенных в таблице 14 данных видно, что вакцинация морских свинок вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л на протяжении всего срока хранения при температуре $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$, вызывает образование у животных антител к вирусам, входящим в состав опытных вакцин. Наиболее высокий уровень антител отмечали у вакцин сразу после изготовления и на протяжении 12 месяцев хранения, к

18 месяцам хранения отмечали снижение титра антител к вирусам ИРТ и ВД в вакцине КОМБОВАК 2+Л, а также к вирусам ИРТ, ВД, РВ, КВ в вакцине КОМБОВАК 4+Л, однако уровень титра антител продолжал оставаться достаточно высоким у всех животных в группе. К 24 месяцам (срок наблюдения) снижение титра антител было существенным, по отдельным антигенам в 2-3 и более раз.

Из приведенных в таблице 15 данных видно, что вакцинация кроликов испытуемыми вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л на разных сроках хранения вызывает образование у животных антител к лептоспирам, входящим в состав опытных вакцин. Наиболее высокий уровень антител отмечали при введении вакцин сразу после их изготовления и на протяжении 12 месяцев хранения. При введении вакцин, хранившихся в течение 18 месяцев, отмечено незначительное снижение уровня антител к лептоспирам. Существенное снижение титра антител у кроликов, вакцинированных опытными образцами, отмечали при хранении препаратов в течение 24 месяцев при температуре 2⁰С – 8⁰С. Однако, даже при таком сроке хранения и соблюдении температурного режима препараты обладали достаточно высокой активностью в отношении лептоспирозного компонента.

Введение опытных образцов вакцин лабораторным животным через 6, 12, 18 и 24 месяцев хранения вызывает формирование выраженного гуморального иммунного ответа. Исходя из анализа полученных результатов, пришли к заключению, что наиболее оптимальным сроком хранения вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в отношении антигенной активности вирусной и бактериальной частей препарата следует считать 18 месяцев с момента изготовления.

3.5 Оценка оптимальной дозы и сроков вакцинации крупного рогатого скота вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, изучение напряженности и продолжительности иммунитета у вакцинированных животных

Основным показателем эффективности вакцин является их активность, выражающаяся в способности формировать стойкий и продолжительный иммунный ответ не только у лабораторных животных, но и у естественно-восприимчивых животных на все компоненты, входящие в их состав.

Опыты на естественно-восприимчивых животных позволяют оценить научно-практическую обоснованность применения вакцин, определить оптимальные дозы и схемы их применения.

В связи с тем, что назначение изучаемых вакцин позиционировалось для профилактики абортос у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у молодняка, встал достаточно сложный вопрос о вакцинации стельных животных экспериментальными препаратами. Для этого неоднократно была доказана безвредность вакцин для лабораторных животных и далее для крупного рогатого скота разных возрастных категорий и групп. Кроме того, в практическом скотоводстве всегда идут процессы перемещения и выбраковки животных. Поэтому важным аспектом явились процессы нумерации животных, отслеживание динамики их передвижения и появления молодняка, их возраст, кормление и содержание, своевременная выпойка молозива.

Основными задачами данного раздела было:

- определить сроки вакцинации крупного рогатого скота с целью профилактики абортос инфекционной этиологии;
- оценить гуморальный иммунный ответ у стельных коров, иммунизированных вакциной КОМБОВАК 4+Л;
- оценить колостральный иммунный ответ у телят;
- определить иммунизирующие дозы вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБО-

ВАК 4+Л для коров и телят.

3.5.1 Оценка активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л с целью профилактики абортос у крупного рогатого скота

По предложенной технологии изготовили образцы вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, которые были проверены по всем показателям, включая стерильность, полноту инактивации вирусов и лептоспир, безвредность и активность на лабораторных животных и безвредность на естественно-восприимчивых животных. С целью определения безвредности испытуемые образцы препаратов крупному рогатому скоту вводили внутримышечно однократно в дозе 4,0 мл. На каждую вакцину использовали по 10 голов КРС. За животными вели наблюдение в течение 10 суток. Все животные оставались клинически здоровыми в течение всего срока наблюдения.

Работа в хозяйстве была начата с определения естественного фона антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ, а также к лептоспирам серогрупп *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona* у не вакцинированного крупного рогатого скота в одном из хозяйств Московской области. Далее поголовье крупного рогатого скота было разделено по принципу аналогов на группы животных (n=30), которых вакцинировали вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л за 2-3 недели до осеменения, во время осеменения и в период 1-3 месяцев стельности.

Вакцины вводили внутримышечно двукратно с интервалом 14 суток в дозах 2,0 мл и 3,0 мл. Кровь у животных брали в динамике после второй вакцинации через 1, 2, 4, 6, 8, 10 месяцев, получали сыворотку крови, которую исследовали на наличие антител в РН к вирусам ИРТ, ВД, РВ, в РТГА к КВ и в РМА на наличие антител к лептоспирам серогрупп *Romona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*. Кроме того, по отношению к лептоспирам исследовали превентивные свойства сыворотки крови вакцинированных животных для золотистых хомячков. Полученные результаты представлены в таблице 16 и 17.

Таблица 16

Антигенная активность вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л) на естественно-восприимчивых животных

Сроки исследований \ Антиген	Средний титр антител к антигенам ... при введении вакцины в дозе											
	2,0						3,0					
	вирус ИРТ	ВД	Р	Т	Г	С	вирус ИРТ	ВД	Р	Т	Г	С
<i>2 – 3 недели до осеменения</i>												
До вакцинации	32	28	15	15	0	10	64	24	17	0	0	30
1 мес. п/вакц.	60	125	373	476	80	100	276	156	673	100	119	476
2 мес. п/вакц.	181	76	200	168	27	40	362	176	400	22	38	238
4 мес. п/вакц.	152	91	168	27	21	47	128	102	400	17	46	58
6 мес. п/вакц.	91	91	181	27	40	27	203	64	252	17	43	93
8 мес. п/вакц.	102	103	252	29	17	46	128	91	141	10	10	45
10 мес. п/вакц.	64	128	252	29	29	46	128	45	71	10	22	17
<i>Во время осеменения</i>												
До вакцинации	25	52	22	5	0	17	30	12	22	0	0	17
1 мес. п/вакц.	71	128	200	63	22	158	158	81	504	100	116	200
2 мес. п/вакц.	152	181	252	29	10	100	145	102	252	49	91	122
4 мес. п/вакц.	181	256	200	17	17	79	181	128	200	22	22	32
6 мес. п/вакц.	256	362	181	10	17	46	132	128	141	22	22	10
8 мес. п/вакц.	128	128	159	22	10	45	128	128	200	10	10	10
10 мес. п/вакц.	91	181	283	22	10	50	64	32	100	10	10	10
<i>1 – 3 месяца стельности</i>												
До вакцинации	20	25	32	0	0	27	40	55	22	0	0	22
1 мес. п/вакц.	30	54	276	37	46	104	151	181	217	47	59	156
2 мес. п/вакц.	161	81	238	18	32	80	161	128	126	17	22	46
4 мес. п/вакц.	102	128	400	22	71	32	322	102	200	17	22	58
6 мес. п/вакц.	102	102	400	22	71	32	256	91	141	22	10	141
8 мес. п/вакц.	91	100	400	50	50	27	132	128	100	10	0	22
10 мес. п/вакц.	91	91	256	22	50	27	101	91	100	12	0	0

Таблица 17

Антигенная активность вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л) на естественно- восприимчивых животных

Сроки исследований \ Антиген	Средний титр антител к антигенам ... при введении вакцины в дозе															
	2,0								3,0							
	вирус ИРТ	ВД	КВ	РВ	Р	Т	Г	С	вирус ИРТ	ВД	КВ	РВ	Р	Т	Г	С
<i>2 – 3 недели до осеменения</i>																
До вак.	64	181	52	45	15	0	32	15	41	32	51	56	10	0	0	15
1 мес. п/в.	215	861	181	424	366	59	67	113	256	215	215	824	336	283	238	183
2 мес. п/в.	108	304	152	256	283	22	38	100	128	108	181	609	200	100	141	56
4 мес. п/в.	54	304	152	181	200	10	22	67	102	161	128	512	400	22	22	80
6 мес. п/в.	54	256	215	181	168	10	18	45	81	81	64	203	147	27	40	141
8 мес. п/в.	128	256	181	256	200	10	10	10	40	128	128	81	117	32	32	100
10 мес. п/в.	128	128	64	256	200	10	10	10	64	64	64	102	93	22	10	100
<i>Во время осеменения</i>																
До вак.	30	34	28	81	80	0	0	10	25	231	18	39	38	0	0	10
1 мес. п/в	91	115	128	609	566	32	56	80	152	904	108	524	600	45	65	100
2 мес. п/в	181	108	152	685	336	21	27	67	64	304	108	624	336	47	22	47
4 мес. п/в	91	91	128	725	168	15	15	168	54	304	76	108	336	10	17	17
6 мес. п/в	108	108	108	692	168	15	15	156	54	256	91	91	336	37	29	59
8 мес. п/в.	91	91	128	512	71	10	22	141	23	181	64	45	283	29	22	37
10 мес. п/в.	64	64	64	362	50	0	0	100	23	128	45	64	141	22	32	50
<i>1 – 3 месяца стельности</i>																
До вак.	102	35	61	52	22	0	0	0	20	20	101	64	25	0	0	17
1 мес. п/в	306	156	128	312	500	93	317	252	103	103	323	813	435	100	93	635
2 мес. п/в.	161	81	161	508	404	46	159	100	64	64	256	1027	317	37	34	400
4 мес. п/в.	362	64	128	264	200	10	22	45	102	102	161	1027	252	46	27	117
6 мес. п/в.	362	64	128	132	141	22	22	10	81	40	128	813	200	10	29	46
8 мес. п/в.	128	64	128	128	50	0	0	0	51	61	161	323	159	37	17	34
10 мес. п/в.	128	64	64	128	50	0	0	10	25	32	161	323	93	17	17	50

Из таблиц видно, что у всех животных был выраженный иммунный ответ на введение вакцины, несмотря на достаточно высокий уровень вируснейтрализующих антител ко всем вирусам до вакцинации. При анализе полученных результатов учитывали прирост антител в два и более раз. Это позволило установить, что оптимальная доза вакцины по отношению к вирусным компонентам должна составлять 3,0 мл.

Анализ данных серологического фона по отношению к лептоспирам показал, что уровень специфических антител у всех животных был значительно ниже диагностического титра (1:50). Животные всех групп отвечали образованием антител, уровень которых значительно превышал исходные титры. Доза вакцины 3,0 мл вызывала образование антител в более высоком титре. Также более высокие титры антител отмечали в группе животных, вакцинированных за 2-3 недели до осеменения. Следует отметить, что у животных с отсутствием антител к лептоспирам тех или иных серогрупп к четырем месяцам после вакцинации титр антител был ниже диагностического. При наличии исходного фона антител, даже в титре ниже диагностического, антитела сохранялись после вакцинации в достаточно высоком титре на протяжении 10 месяцев (срок наблюдения).

Выбрать преимущества той или иной схемы вакцинации в хозяйстве по титру антител при наличии исходного фона мы посчитали затруднительным, и по отношению к лептоспирозному компоненту использовали критерий оценки превентивной активности сыворотки крови вакцинированных животных.

Кроме того, во всех группах иммунизированных животных не было отмечено ни одного случая аборта или мертворождения.

3.5.2 Динамика превентивной активности сыворотки крови вакцинированных коров к лептоспирам

В связи с ubicвитарной распространенностью лептоспироза и наличия

антител в диагностическом титре у сотен тысяч животных, оценить эффективность вакцин против лептоспироза на естественно-восприимчивых животных достаточно часто не представляется возможным. В этой связи, одним из требований к вакцинам против лептоспироза является ее иммуногенная активность, которая определяется двумя методами: по величине 50%-ной иммунизирующей дозы и по превентивной активности сыворотки крови вакцинированных животных для золотистых хомячков. В своей работе мы выбрали второй метод, как наиболее простой и приемлемый, так как в испытании участвует сыворотка крови вакцинированных естественно-восприимчивых животных. Данная методика отработана для животных разных видов, хорошо зарекомендовала себя для оценки эффективности вакцин против лептоспироза [52], в том числе и ассоциированных (Л.М. Первова, 1988; И.И. Скворцова, 1992; Н.Г. Орел, 2006) и изложена в главе «Материалы и методы». В качестве оценки вакцины сформулирован следующий постулат. Сыворотка крови вакцинированных животных в первые месяцы должна предохранять от гибели в дозе 0,5 мл 80-100%, а в конце указанного срока иммунитета – 30-40% хомячков, зараженных смертельной дозой лептоспир. При защите меньшего числа хомячков, животное следует рассматривать как не иммунное [53].

Сыворотку крови крупного рогатого скота, полученную в предыдущем опыте, оценивали по превентивной активности для золотистых хомячков с последующим их заражением.

Результаты превентивной активности сыворотки крови вакцинированных животных представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18

Превентивная активность сыворотки крови крупного рогатого скота, вакцинированного вакциной КОМБОВАК 2+Л, для золотистых хомячков

Доза	Количество выживших золотистых хомячков, %						
	Срок получения сыворотки после вакцинации/ группа животных						
	до вакц.	1 мес	2 мес	4 мес	6 мес	8 мес	10 мес
	За 2-3 недели до осеменения						
2,0 мл	10	60	100	100	100	70	60
3,0 мл	10	70	100	90	100	80	80
	Во время осеменения						
2,0 мл	20	70	100	100	100	80	50
3,0 мл	10	80	100	100	100	80	60
	1-3 месяца стельности						
2,0 мл	10	70	100	100	90	80	60
3,0 мл	20	80	100	100	100	90	70
ВГНКИ (контроль)	10	80	100	100	100	80	80
Не вакцинированные хомячки	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 19

Превентивная активность сыворотки крови крупного рогатого скота, вакцинированного вакциной КОМБОВАК 4+Л, для золотистых хомячков

Доза	Количество выживших золотистых хомячков, %						
	Срок получения сыворотки после вакцинации/ группа животных						
	до вакц.	1 мес	2 мес	4 мес	6 мес	8 мес	10 мес
	За 2-3 недели до осеменения						
2,0 мл	10	60	100	100	100	70	60
3,0 мл	10	80	100	100	100	80	80
	Во время осеменения						
2,0 мл	20	70	100	100	100	70	50
3,0 мл	10	80	100	100	100	90	60
	1-3 месяца стельности						
2,0 мл	20	80	100	100	90	70	50
3,0 мл	20	80	100	100	100	90	60
ВГНКИ (контроль)	10	80	100	100	100	90	70
Не вакцинированные хомячки	-	-	-	-	-	-	-

Исходя из 40%-ного критерия защиты золотистых хомячков, полученные данные свидетельствуют о высокой степени защиты крупного рогатого скота, вакцинированного вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л независимо

от дозы вакцины и сроков вакцинации. Превентивная активность данных вакцин не уступала таковой в контроле, в качестве которого использовалась поливалентная вакцина против лептоспироза животных ВГНКИ, тогда как не вакцинированные хомячки не имели защитных антител, их гибель наступала на 4-5 день после заражения.

Полученные результаты дают основание рекомендовать с целью профилактики абортов вирусной и лептоспирозной этиологии проводить вакцинацию коров двукратно внутримышечно с интервалом 14 суток за 2-3 недели до осеменения в дозе 3,0 мл.

Вакцинация стельных животных с целью профилактики абортов лептоспирозной этиологии может иметь свои ограничения в связи с широкой распространенностью лептоспир серовара *hardjio*. Несмотря на позитивность полученных результатов, мы решили отказаться от вакцинации животных в период 1-3 месяцев стельности в связи с наличием информации о возможности абортов лептоспирозной этиологии вызванных лептоспирами серовара *hardjio*, не во второй половине стельности, что характерно для лептоспирозной инфекции, а начиная с 4-х месяцев стельности коров [121].

3.5.3 Оценка гуморального иммунного ответа у стельных коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л и телят

Новорожденные телята, полученные от не вакцинированных стельных коров, являются незащищенными от ряда вирусных и бактериальных агентов. В этой связи, вакцинация стельных коров имеет немаловажное значение и направлена на создание колострального иммунитета у молодняка.

Однако, известно, что трансплацентарная передача антител от матери плоду зависит, в первую очередь, от типа плаценты. В случае гемохориальной (человек,

обезьяна) и гемэндотелиохориальной (кролик, морская свинка) плаценты передача иммуноглобулинов класса G происходит в пренатальный период. В случае синдесмохориальной плаценты (корова, овца, коза) передача иммуноглобулинов в пренатальный период невозможна и осуществляется только в постнатальный период, т.е. единственный путь получения антител телятами – своевременная выпойка им молозива от матерей, вакцинированных в последнем триместре стельности.

Для оценки антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л вакцинировали по 2 группы стельных коров (n=10) внутримышечно двукратно первый раз за 50-60 суток до предполагаемого отела, второй – через 2-3 недели, но не позднее 30 суток до отела в дозах 2,0 мл и 3,0 мл. Особо следили за прохождением отелов и своевременной, не позднее двух часов после отела, выпойкой молозива.

Кровь у коров брали до вакцинации и сразу после отела, у телят кровь брали на 7, 14, 30 и 45 сутки после рождения. Контролем служили телята аналогичного возраста, полученные от не вакцинированных коров.

Полученный материал исследовали на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и лептоспирам соответственно в реакции нейтрализации и в реакции микроагглютинации, к КВ в РТГА, к лептоспирам, кроме того, по превентивной активности сыворотки крови коров и телят для золотистых хомячков, зараженных 10 LD₅₀ вирулентного штамма лептоспир. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20

Антигенная и превентивная активность сыворотки крови стельных коров после иммунизации вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л

Сыворотка	КОМБОВАК 2+Л				КОМБОВАК 4+Л					
	Титр антител к:			Превент акт-ть, %	Титр антител к:					Превент акт-ть, %
	Вирусу ИРТ	ВД	Лептоспирам		Вирусу ИРТ	ВД	РВ	КВ	Лептоспирам	
До вакцинации	32	51	10	10	81	32	64	32	17	-
После вакц. в дозе 2,0 мл	102	161	192	70	128	128	181	108	127	80
До вакцинации	91	81	10	20	91	51	45	76	15	10
После вакц. в дозе 3,0 мл	203	256	366	100	256	256	323	512	372	100

При введении вакцин глубокостельным коровам в дозе 2,0 мл и 3,0 мл отмечали иммунный ответ ко всем антигенам, входящим в состав вакцин. Наиболее высокий уровень антител отмечали при введении вакцин в дозе 3,0 мл, сыворотка крови коров, получавших данную дозу препарата, предохраняла от гибели 100% золотистых хомячков.

Результаты оценки колюстрального иммунитета у телят, полученных от стельных коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 2+Л, представлены в таблице 21.

Таблица 21

Оценка колострального иммунитета у телят при использовании вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л)

Возраст новорожденных телят, недель	Антигенная активность вакцины к вирусным антигенам при дозе вакцины (мл)				Превентивная активность сыворотки крови телят для золотистых хомячков, % при дозе вакцины	
	Вирус ИРТ		ВД			
	2,0	3,0	2,0	3,0	2,0	3,0
Опытная группа**						
1	194,5±20,2	222,2±12,6	335,9±26,8	384,6±20,4	90	100
2	167,4±26,6	198,6±10,9	202,5±16,8	228,6±12,7	60	80
4	94,2±15,7	100,8±8,9	84,2±12,6	112,4±10,6	50	50
6	30,5±8,4	56,6±5,9	42,5±8,7	45,2±10,3	30	40
Контрольная группа						
1	32,6±7,4	38,9±8,6	34,5±6,2	64,0±10,8	0	0
2	15,8±4,2	12,2±2,6	18,7±5,8	10,7±5,7	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

В результате данного исследования установлено, что вакцинация стельных коров вакциной КОМБОВАК 2+Л обеспечивает создание колострального иммунитета у телят, полученных от вакцинированных животных и получавших своевременно молозиво от своих матерей. Формирование колострального иммунитета подтверждается высокими титрами специфических антител к вирусным компонентам и превентивной активностью к лептоспирам, которые сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Наиболее высокая превентивная активность и титры антител отмечены при введении вакцины стельным коровам в дозе 3,0 мл.

Результаты оценки колострального иммунитета у телят, полученных от стельных коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 4+Л, представлены в таблице 22.

Таблица 22

Оценка колострального иммунитета у телят при использовании вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л)

Возраст новорожденных телят, недель	Антигенная активность вакцины к вирусам в дозе 3,0 мл				Превентивная активность сыворотки крови телят для золотистых хомячков (%), при дозе вакцины (мл)	
	ИРТ	ВД	РВ	КВ	2,0	3,0
Опытная группа**						
1	406,2±36,0	256,0±36,8	361,2±26,4	866,2±41,1	80	90
2	362,4±28,5	81,6±22,5	162,5±22,8	521,3±34,2	60	70
4	161,1±25,6	68,3±12,4	128,0±18,4	64,0±22,1	40	60
6	62,5±21,9	36,2±10,6	62,3±16,4	32,0±15,6	20	40
Контрольная группа						
1	16,2±8,5	26,6±12,6	20,3±10,1	24,3±8,9	0	20
2	10,2±4,6	12,1±4,2	8,3±5,5	10,7±5,7	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

Данные по оценке колострального иммунитета телят, представленные в таблице, аналогичны таковым при использовании вакцины КОМБОВАК 2+Л. Титр антител у телят к вирусным антигенам при дозе вакцины стельным коровам 2,0 мл был не существенно ниже, чем при дозе 3,0 мл и нами не представлен. Однако в опытной группе он был значительно выше, по сравнению с контрольной, независимо от дозы вакцины стельным коровам. Превентивная активность сыворотки крови телят, получавших своевременно дозу молозива, была также несколько выше при дозе вакцины стельным коровам 3,0 мл. И в одном и в другом случае колостральный иммунитет сохранялся у телят в течение 6 недель (срок исследования), однако согласно приведенному выше критерию, невосприимчивость крупного рогатого скота к лептоспирозу сохраняется до тех пор, пока сыворотка крови предохраняет от гибели не менее 40% золотистых хомячков, зараженных смертельной дозой лептоспир. Используя данный

критерий, доза вакцины должна быть не менее 3,0 мл.

В данных опытах установлена зависимость между содержанием специфических колостральных антител в сыворотке крови телят и титром специфических антител в сыворотке крови вакцинированных матерей. Наиболее высокие титры антител отмечали у телят, получавших молозиво от матерей, вакцинированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в дозе 3,0 мл. Аналогичные результаты получены по превентивной активности сыворотки крови телят. Таким образом, данная коррелятивная связь подтверждена по отношению как к вирусному, так и к лептоспирозному компонентам.

3.5.4 Определение иммунизирующей дозы вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для телят

Иммунизирующую дозу вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для телят определяли также по антигенной активности компонентов, входящих в состав вакцин и к лептоспирам по превентивной активности сыворотки крови телят для золотистых хомячков.

С этой целью телят в возрасте 40-45 суток, рожденных от не вакцинированных матерей, формировали также в 3 группы по 20 голов в каждой, из них 2 группы опытных животных и 1 – контрольная. Телятам опытных групп исследуемую комбинированную вакцину вводили внутримышечно в дозе 1,0 мл и 2,0 мл. Ревакцинацию проводили через 20-25 суток после первой иммунизации в тех же дозах. Телятам контрольной группы вакцину не вводили.

Перед каждым введением препарата и через 21 сутки после первой и второй вакцинации у всех животных брали кровь и определяли уровень вирусспецифических антител в сыворотке крови в РН (к КВ – РТГА), а также превентивную активность сыворотки крови вакцинированных телят для золотистых хомячков, зараженных 10 LD₅₀ вирулентного штамма лептоспир.

Результаты испытаний представлены в таблице 23 и 24.

Таблица 23

Уровень специфических антител в сыворотке крови телят, иммунизированных комбинированной вакциной КОМБОВАК 2+Л

Группа животных	Доза вакцины, мл	Титр вируснейтрализующих антител, М±m			
		К вирусу	До вакцинации	Через 21 сут. после 1-й вакцинации	Через 21 сут. после 2-й вакцинации
Опытная группа					
1	1,0	ИРТ	7,4±3,2	28,8±6,2**	200,9±26,2**
		ВД	16,6±3,6	48,5±10,2**	187,4±36,6**
		Лептоспиры***	10	50	70
2	2,0	ИРТ	8,6±2,4	30,9±8,6**	394,0±28,9**
		ВД	14,4±3,5	59,7±6,7**	274,4±12,7**
		Лептоспиры***	10	70	90
Контрольная группа					
3	-	ИРТ	10,2±2,5	12,3±2,9	7,5±2,1
		ВД	15,6±3,6	14,4±4,1	20,2±8,3
		Лептоспиры***	20	10	10
*** Превентивная активность сыворотки вакцинированных телят для золотистых хомячков, зараженных 10 LD ₅₀ , %					

Таблица 24

Уровень специфических антител в сыворотке крови телят,
иммунизированных комбинированной вакциной КОМБОВАК 4+Л

Группа животных	Доза вакцины, мл	Титр вируснейтрализующих антител, М±m			
		К вирусу	До вакцинации	Через 21 сут. после 1-й вакцинации	Через 21 сут. после 2-й вакцинации
Опытная группа					
1	1,0	ИРТ	12,2±7,4	38,7±12,4**	212,3±28,1**
		ВД	26,2±5,6	36,4±11,0**	241,4±26,3**
		РВ	16,5±5,8	41,9±13,5**	384,0 ±31,2**
		КВ	20,7±6,2	33,5±14,9**	126,8±21,8**
		Лептоспиры***	10	50	70
2	2,0	ИРТ	18,1±6,4	36,4±12,2**	421,0±36,3**
		ВД	24,2±8,5	56,1±11,6**	306,4±22,7**
		РВ	18,9±5,7	35,8±10,9**	456,8±32,5**
		КВ	26,8±7,3	44,1±21,3**	263,4±18,6**
		Лептоспиры***	10	70	100
Контрольная группа					
3	-	ИРТ	16,2±8,5	12,3±2,9	6,5±4,2
		ВД	26,6±12,6	20,4±8,1	12,2±8,3
		РВ	20,3±10,1	16,2±8,4	10,1±6,2
		КВ	24,3±8,9	16,2±8,4	8,7±3,6
		Лептоспиры***	0	10	0
*** Превентивная активность сыворотки вакцинированных телят для золотистых хомячков, зараженных 10 LD ₅₀ , %					

Данные таблиц свидетельствуют о том, что иммунизация телят опытных групп вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л приводит к формированию выраженного иммунного ответа и статистически достоверному приросту антител и превентивной активности сыворотки крови вакцинированных животных.

Максимальное содержание антител ко всем вирусам регистрируют на 21-е сутки после второй вакцинации каждой из двух испытуемых доз вакцины. Наиболее высокий титр вируснейтрализующих антител выявляется у телят при введении вакцины в дозе 2,0 мл. Максимальная превентивная активность

сыворотки крови также выражена у телят той же опытной группы.

По итогам выполнения задач, поставленных в данном разделе, и анализа полученных результатов можно сделать следующее заключение:

- вакцинация крупного рогатого скота, в том числе стельных животных, и телят инактивированными комбинированными вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л не вызывает каких либо местных или общих патологических реакций организма;

- вакцинация крупного рогатого скота и телят вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л сопровождается выработкой специфических антител ко всем антигенам, входящим в состав вакцин, что подтверждается в реакциях нейтрализации и микроагглютинации, а также превентивной активностью сыворотки крови вакцинированных животных;

- рекомендована схема иммунизации коров вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для предупреждения нарушения функции воспроизводства у животных;

- вакцинация глубокостельных коров вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л сопровождается формированием колострального иммунитета у телят высокой напряженности продолжительностью до 6-недельного возраста при условии своевременной выпойки молозива;

- отработана оптимальная иммунизирующая доза инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, которая составляет для взрослых животных 3,0 мл, для телят – 2,0 мл.

3.6 Применение вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в производственных условиях

Полученные нами результаты при проведении опытов на естественно-восприимчивых животных подтвердили литературные данные, что у крупного рогатого скота, как правило, отмечают циркуляцию одновременно двух и более возбудителей наиболее опасных инфекций, к которым относятся вирусы ИРТ, ВД, РВ и КВ, а также лептоспиры. Данная тенденция стимулирует разработку и внедрение в ветеринарную практику новых эффективных комбинированных препаратов, обеспечивающих надежную защиту животных одновременно против нескольких наиболее распространенных инфекционных агентов. Применение комбинированных препаратов снижает затраты на ветеринарные мероприятия и позволяет снизить количество стрессов для животных, обеспечить в минимально короткие сроки формирование иммунитета одновременно к нескольким возбудителям, что особенно важно в сложных эпизоотических условиях.

При разработке ассоциированных препаратов необходимо учитывать особенности возбудителей, патогенез, иммуногенез и клинические проявления заболеваний.

Изучение эффективности инактивированных комбинированных вакцин провели в АО ПХ «Наро-Осановский».

Предварительное серологическое исследование поголовья крупного рогатого скота показало, что практически у всех животных присутствуют антитела к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ. Количество животных от числа обследованных с наличием антител к вирусам составило соответственно 65,5%, 90,0%, 81,4% и 85,5%. У 67,5% животных были обнаружены вируснейтрализующие антитела одновременно к двум-четырем вирусам.

Количество положительных реакций к лептоспирам серогрупп *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona* составил соответственно 32,3%, 9,3%, 11,2% и

47,2%. Наличие антител может быть свидетельством инфицирования животных или ранее проведенной вакцинации, хотя в предшествующие работе 2 года вакцинация в хозяйстве не проводилась.

Результаты полученных исследований представлены на рисунках 1 и 2.

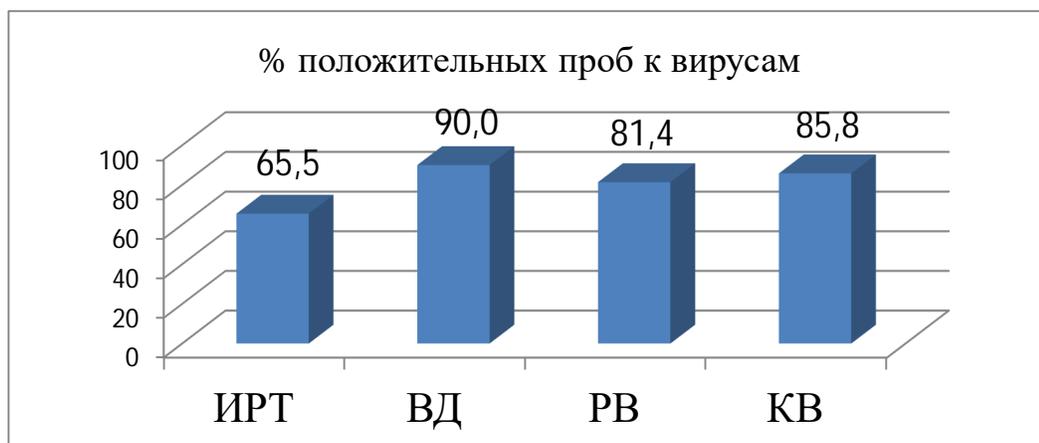


Рисунок 1. Процент положительных проб к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ у крупного рогатого скота от числа обследованных до проведения опыта в хозяйстве



Рисунок 2. Процент положительных реакций к лептоспирам разных серогрупп до вакцинации

По нашему мнению, иммунопрофилактика в аналогичных хозяйствах, стационарно неблагополучных по вышеуказанным инфекциям, является необходимым звеном в системе противозoonотических мероприятий, а применение вакцин научно и практически обоснованно.

Как было описано в обзоре литературы инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, ротавирусная и коронавирусная инфекции опасны не только для взрослого КРС, но и для молодняка. Поскольку потомство после рождения не имеет защитных антител к данным вирусам, необходимо уделять особое внимание созданию колострального иммунитета у новорожденных телят. Поэтому разработанные нами вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, кроме защиты стельных коров от абортос, также направлены на создание колострального иммунитета у новорожденных телят, но только при условии своевременной выпойки молозива от иммунизированных животных.

В этой связи, мы поставили задачу оценить уровень защитных вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированного крупного рогатого скота, в молозиве и у телят, полученных от иммунизированных коров. Для выполнения данной задачи вакцинировали стельных коров (n=30 на каждый препарат) внутримышечно дважды в дозе 3,0 мл – первый раз за 50-60 суток до отела, второй раз через 3 недели после первой иммунизации, но не позднее 30 суток до отела. Кровь и молозиво у коров брали сразу после отела, а у телят (n=30) через 7-14 суток после рождения. В качестве контроля использовали телят (n=10), рожденных от не вакцинированных животных.

Результаты представлены в таблице 25 и на рисунке 3 и 4.

Таблица 25

Уровень антител в сыворотке крови телят, в сыворотке крови и молозиве коров, вакцинированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л

Исследуемый материал	КОМБОВАК 2+Л		КОМБОВАК 4+Л			
	Средний титр антител к вирусам:					
	ИРТ	ВД	ИРТ	ВД	РВ	КВ
Сыворотка крови вакцинированных коров	394±30,2	338±24,2	862±40,5	164±20,4	876±39,5	282±18,6
Молозиво от вакцинированных коров	206±14,2	286±16,5	504±38,2	208±18,6	952±50,2	1348±74,5
Сыворотка крови телят, полученных от вакцинированных коров	212±10,5	362±19,8	396±34,0	235±34,4	372±26,0	822±40,5
Сыворотка крови телят, полученных от не вакцинированных коров	10±2,5	12±2,2	13±2,4	16±2,6	38±8,6	20±4,5

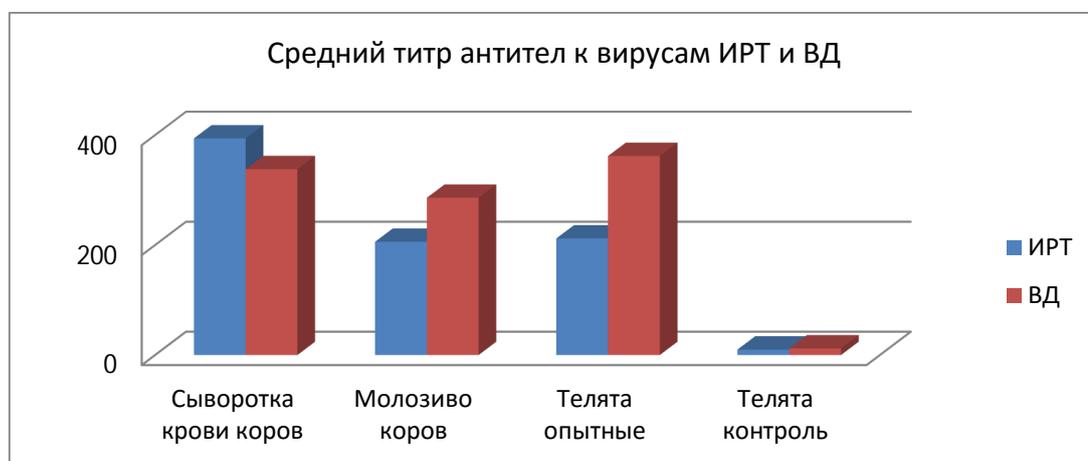


Рисунок 3. Уровень антител в сыворотке крови и молозиве коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 2+Л, и в сыворотке крови их телят.

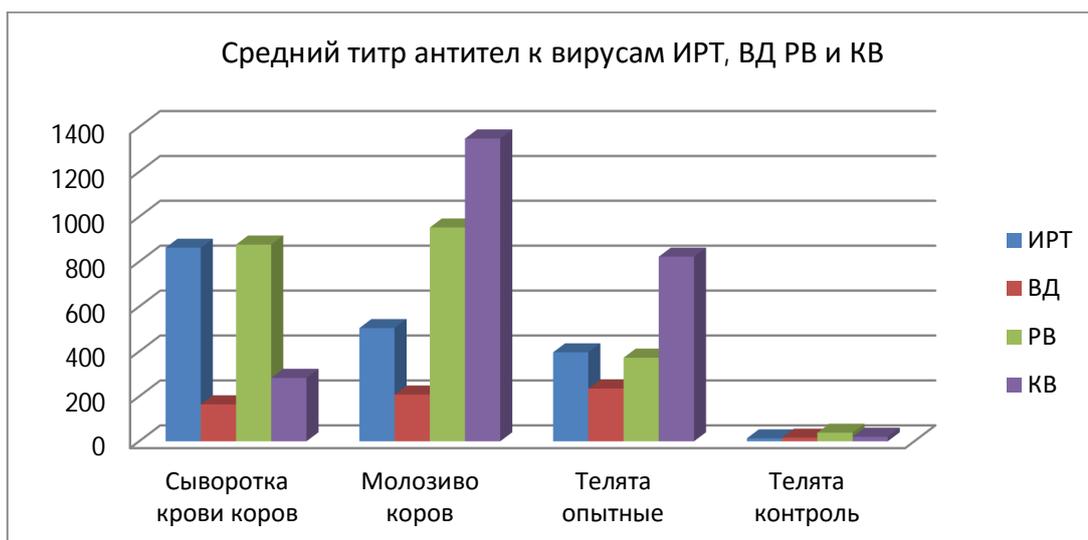


Рисунок 4. Уровень антител в сыворотке крови и молозиве коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 4+Л, и в сыворотке крови их телят.

Из таблицы 25 и рисунка 3 и 4 видно, что в сыворотке крови и молозиве вакцинированных отелившихся коров отмечен высокий уровень защитных вируснейтрализующих антител. У телят, рожденных от иммунизированных коров, уровень защитных антител к соответствующим возбудителям, входящим в состав вакцин, в 9-41 раз выше, чем у телят, полученных от не иммунизированных животных, что еще раз подтверждает высокий иммунный статус вакцинированных коров.

Кроме определения уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови телят, нами была поставлена задача, определить превентивную активность сыворотки крови телят, полученных от иммунизированных коров к лептоспирам. Результаты исследований представлены в таблице 26.

Таблица 26

Превентивная активность сыворотки крови телят, полученных от
иммунизированных коров

Наименование сыворотки	Количество выживших золотистых хомячков, %
Сыворотка крови телят от коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 2+Л	100
Сыворотка крови телят от коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 4+Л	100
Сыворотка крови телят от не вакцинированных коров	20
Не вакцинированные хомячки	-

Из таблицы видно, что полученные данные свидетельствуют о высокой степени защиты телят, полученных от коров иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Сыворотка телят, полученных от не вакцинированных коров, не защищает телят от инфицирования лептоспирами и последующего лептоспиросительства.

На основании проведенных исследований разработана и утверждена инструкция по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л) и инструкция по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы из возбудителей инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, вызывающих массовые заболевания с поражением органов дыхания, пищеварения, а самое главное репродуктивной системы, играют основную роль вирусы ИРТ, ВД. У новорожденных телят и телят первых 2 месяцев жизни большую проблему представляют вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ, когда болезнь у телят протекает в респираторной форме или с признаками гастроэнтерита (ИРТ), поражением желудочно-кишечного тракта и диареей (ВД, РВ, КВ) с большой вероятностью летальных исходов [50, 139, 84, 48, 46].

У стельных животных вирус ИРТ может вызывать гибель эмбриона, на более поздних стадиях стельности – гибель плода и аборт или же рождение нежизнеспособных, гибнущих в первые сутки телят [190, 142, 24]. Действие вируса на плод выражают в постепенном прекращении плацентарного кровообращения и последующей дегенерации плаценты, что сопровождается абортами [150]. Другие исследователи [50,149] свидетельствуют о поражении плода без патологических изменений в плаценте. Это говорит о том, что плод может быть местом первичного размножения вируса [106, 84].

У взрослых животных ВД в основном протекает в хронической и субклинической формах и сопровождается абортами, иммуносупрессией, персистентной инфекцией, рождением слабого потомства [188, 137, 124].

При абортивном течении ВД у коров у абортированных плодов раннего возраста наблюдают геморрагические изъязвления слизистой оболочки, очаги некроза в легких, в головном мозге, воспалительные поражения околоплодных оболочек и кожного покрова [21, 51].

Многие авторы показали существенную связь между инфицированием вирусом диареи с абортами у коров, диареей новорожденных телят и респираторными заболеваниями у телят старше 3-4 месячного возраста [35, 185, 21, 48, 46].

Ротавирусная и коронавирусная инфекции поражают только новорожденных телят.

Клинически ротавирусная инфекция проявляется у телят в виде депрессии, потери аппетита, диареи, дегенерации мышечной ткани. На патогенность ротавируса и тяжесть течения болезни у телят могут влиять многочисленные факторы: штамм и доза вируса, возраст телят во время инфицирования, возможные сопутствующие инфекции [156, 18]. Наличие циркулирующих в крови антител недостаточно для предотвращения ротавирусной диареи у телят. Антитела должны находиться в просвете кишечника [147, 145].

Коронавирусной инфекцией болеют телята в возрасте 8-9 дней. Заболевание может протекать латентно. Клинически здоровый КРС может быть хроническим носителем вируса, выделяя его с фекалиями в течение 3 месяцев [129, 147, 182, 16]. Особенностью коронарусной инфекции является то, что коронавирус размножается как в кишечнике, так и в респираторном тракте телят. Однако, несмотря на размножение в респираторном тракте, коронавирус КРС сам по себе не может вызывать заболевание телят. Колостральные антитела, содержащиеся в просвете кишечника, в титре $5 \log_2$ и выше предотвращают размножение коронавируса [37, 48, 46].

Ассоциативные вирусные инфекции у крупного рогатого скота, вызываемые вирусами ИРТ, ВД, РВ и КВ постоянно отмечают в различных странах мира. При этом вышеуказанные вирусы в виде ассоциаций вызывают у крупного рогатого скота различных половозрастных групп респираторные заболевания, диарею, бесплодие, поражение генитальных органов у коров. Так по данным Н. Weerule, А. Brunner (2002) ассоциации ИРТ, ВД и аденовирусов отмечены при респираторных заболеваниях от 11 до 34% случаев, при диареях – от 4 до 42%, при бесплодии – от 5 до 23%.

Ряд исследователей установили взаимосвязь вирусных заболеваний молодняка с нарушением воспроизводительной функции у взрослого крупного

рогатого скота [4, 155, 157, 162].

Симптомы нарушения воспроизводительной функции коров, вызываемые вирусами, согласно Е.В. Андреева с соавт. (1979) подразделяют по отношению к стадиям репродуктивного цикла на 3 основные группы:

- заболевания полового аппарата, исключая возможность оплодотворения коров и телок;
- повреждение и гибель плода с последующим прерыванием стельности (абортами), то есть пренатальная смертность у стельных животных;
- заболевания и гибель телят после рождения (постнатальная заболеваемость и смертность).

Таким образом, исследования, проведенные в различных странах мира по установлению роли ассоциаций вирусов в патологии репродуктивной системы органов крупного рогатого скота, показали их широкое распространение. При этом ведущую роль играют вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ, РС, лептоспиры, хламидии, микоплазмы и др. [50, 59, 46].

Из данных литературы видно насколько широко распространены патогенные лептоспиры (*Leptospira interrogans*) во всем мире. Болезнь зарегистрирована во всех странах и континентах. Однако, показатель инфицированности всегда будет разным. Инфицированность выше в странах Юго-Восточной Азии и Южной Америке, что связано не только с климатическими условиями, но и с социально-экономическими. Показатель инфицированности определяется не только по стране в целом, но и по отдельным ее регионам.

Нами изучена инфицированность лептоспирами и этиологическая структура лептоспироза по разным регионам в период с 1996 по 2011 годы. Количество исследований на лептоспироз диагностическими лабораториями страны крупного рогатого скота составило 9 478 516 голов, инфицированность по стране за этот период составляла 19,3%. В динамике по годам отмечена четкая тенденция к снижению показателя инфицированности с 25,1% в 1996 г

до 9,4% в 2011 г. Инфицированность по регионам России также значительно отличалась от средних данных по стране. Наиболее высокой инфицированность была в Уральском (32,6%), Центральном (29,9%) и Северо-Западном (27,9%) регионах, наиболее низкой – в Южном (5,9%), Дальневосточном (8,5%) и Сибирском (11,3%) регионах.

Наиболее частыми возбудителями лептоспироза крупного рогатого скота в России являются лептоспиры серологических групп: *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Romona*, количество положительных реакций с лептоспирами этих серогрупп в среднем составляло соответственно 21,0%, 20,5%, 7,1%, 7,0% и 5,7% (таблица 2).

По разным регионам количество положительных реакций с лептоспирами этих серогрупп также существенно отличается от средних показателей. В динамике по годам отмечено увеличение числа положительных реакций с лептоспирами серогруппы *Romona* с 4,6% (1996 г) до 8,6% (2011 г), а также с лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae* – с 1,7% до 4,3%. Тенденция в отношении иктерогеморрагических лептоспир является настораживающей, особенно в Южном и Северо-Западном регионах, где отмечают случаи заболевания людей, в том числе с высокой летальностью, обусловленной данной серогруппой лептоспир. Это подчеркивает необходимость проведения постоянного мониторинга за этиологической структурой лептоспироза и своевременной корректировки состава средств специфической профилактики. Кроме того, следует помнить, что инфицирование животных, в большинстве случаев, заканчивается образованием антител в сравнительно невысоком титре и у многих животных – лептоспираносительством, продолжительность которого может исчисляться годами. При этом животные-лептоспираносители инфицируют внешнюю среду и представляют собой основной источник возбудителя инфекции для здоровых животных и человека.

Наиболее часто лептоспироз протекает бессимптомно, единственным

признаком болезни может быть аборт, иногда агалактия, нетипичный мастит. При вводе лептоспиросителей в благополучное по лептоспирозу хозяйство аборт могут носить массовый характер [57].

Лептоспиры, наряду с другими микроорганизмами, играют весьма значительную роль в патологии воспроизводства, и вызывают аборт, рождение мертвых или нежизнеспособных телят, прохолосты и т.д. Аборт при вспышке лептоспироза описали Рассказчиков (1938) у 20% животных, А.А. Черноштанов и А.П. Шатров (1975) – у 26%. Аборт могут происходить в разное время после заражения и, как правило, во второй половине стельности. Иногда аборт бывает единственным клиническим признаком инфекции [121].

Таким образом, сходные клинические признаки могут быть обусловлены самыми разными возбудителями, как вирусной, так и бактериальной этиологии.

Эпизоотологическая ситуация в хозяйствах достаточно часто требует создания невосприимчивости одновременно к нескольким инфекциям, причем в самые короткие сроки. При этом моновакцины не способны решить проблему, так как рассчитаны на профилактику какой-либо одной болезни [44].

Обзор литературных данных по вопросам разработки ассоциированных вакцин и методам комплексной вакцинации показал, что организм животных способен к полноценному иммунному ответу на введение большого количества в одной прививочной дозе антигенов живых и инактивированных, бактериальных, вирусных и других [160].

Количественные соотношения антигенов должны подбираться экспериментально с учетом возможного проявления феномена конкуренции или синергизма. Для преодоления взаимоуогнетающего влияния, если оно имеется, необходимо подобрать оптимальные соотношения антигенов в препарате [20, 64].

Выше изложенные материалы позволили сделать вывод об актуальности вопроса разработки средств специфической профилактики инфекционных

болезней, вызывающих патологию репродуктивной системы у крупного рогатого скота.

Путем анализа литературных данных и собственных наблюдений пришли к заключению, что наибольшую распространенность в хозяйствах РФ среди крупного рогатого скота имеют вирусы ИРТ, ВД, рота- и коронавируса. Из бактериальных агентов наиболее убиквитарными явились, по нашему мнению, лептоспиры. Одним из клинических признаков, а иногда и единственным, объединяющим этих возбудителей в одну группу, является аборт, иногда мертворождение, рождение телят вирусо- и лептоспириноносителей.

Таким образом была поставлена цель создания вакцин против:

- инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, а также лептоспироза, вызываемого лептоспирами серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe (КОМБОВАК 2+Л);

- инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза, вызываемого лептоспирами серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa и Sejroe (КОМБОВАК 4+Л). Вакцины могут быть использованы для предупреждения инфекционных болезней крупного рогатого скота, сопровождающихся нарушением функций репродуктивной системы различной степени тяжести и создания колострального иммунитета у потомства.

В зависимости от инфекционной активности вирусов были изготовлены несколько вариантов вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, которые испытали на стерильность, полноту инактивации вирусов и лептоспир, безвредность, антигенную активность на лабораторных моделях животных. В качестве адьюванта использовали гидроокись алюминия.

По результатам испытаний экспериментальных образцов все варианты вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л были стерильными, безвредными и обладали выраженной антигенной активностью, как к вирусному компоненту (вирусы ИРТ, ВД, РВ и КВ), так и к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi,

Grippotyphosa и Sejroe.

Однако в вариантах вакцин, содержащих 30% гидрата окиси алюминия антигенная активность была ниже, чем у вариантов, содержащих 20% гидрата окиси алюминия, также высокая концентрация ГОА приводила к нежелательным последствиям – слеживаемости осадка.

На основании полученных данных был сделан вывод об отсутствии интерференции между вирусными (вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ) и бактериальным (лептоспиры) компонентами в составе данных ассоциаций.

Таким образом, была подобрана схема изготовления вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, правильность ее показана путем изучения антигенной активности на чувствительных лабораторных моделях (морские свинки и кролики). В состав вакцины КОМБОВАК 2+Л вошли производственные штаммы вирусов ИРТ, ВД и лептоспиры серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa и Sejroe. В состав вакцины КОМБОВАК 4+Л вошли производственные штаммы вирусов ИРТ, ВД, РВ, КВ и производственные штаммы лептоспир серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa и Sejroe. Оптимальное количество адьюванта в обоих препаратах составляло 20%.

После изготовления экспериментальных образцов были отработаны методы биологического контроля вакцин на лабораторных животных. Для определения антигенной активности вакцин в отношении вирусных компонентов опытным путем была подобрана однократная иммунизация морских свинок вакцинами в дозе 0,5 мл, а в отношении лептоспирозного компонента – кроликов из расчета в дозе не менее 15 млн микробных клеток лептоспир каждой серогруппы. Кроме антигенной активности вакцин в отношении лептоспирозного компонента, сыворотки крови вакцинированных кроликов исследовали на превентивную активность на золотистых хомячках. Сыворотки кроликов, вакцинированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, имели высокий уровень превентивной активности.

В качестве контроля использовали коммерческие вакцины: вакцину инактивированную комбинированную против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота (КОМБОВАК) и вакцину поливалентную ВГНКИ против лептоспироза животных. По антигенной активности всех компонентов и превентивной активности в отношении лептоспирозного компонента вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л не уступали коммерческим препаратам.

При разработке и внедрении в практику новых средств специфической профилактики необходимым условием является стабильность сохранения ими физико-химических показателей, антигенных и иммуногенных свойств в течение всего срока годности, что и обеспечивает эффективность применения этих препаратов. Поэтому одной из задач было изучение антигенной и иммуногенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения. В результате ряда опытов на лабораторных животных установлен оптимальный срок хранения данных вакцин в течение 18 месяцев при температуре $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$.

Следующим этапом нашей работы было проведение испытаний экспериментальных серий инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л на естественно-восприимчивых животных.

Важной была задача определения фона антител в хозяйстве до проведения опытов. Однако в связи с широким распространением вирусов ИРТ, ВД, РВ и КВ, а также лептоспироза КРС нам не удалось найти хозяйства благополучного по данным инфекциям.

Антигенную активность вирусных компонентов и лептоспирозного, оптимальные сроки вакцинации и иммунизирующую дозу экспериментальных вакцин определяли на коровах и телятах в сравнительных экспериментах. Животных подбирали и формировали в группы по принципу аналогов. Результаты экспериментов при использовании вакцин КОМБОВАК 2+Л и

КОМБОВАК 4+Л показали, что наиболее высокий титр вируснейтрализующих антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ, КВ и лептоспирам установлен у коров при вакцинации препаратов в дозе 3,0 мл, а у телят в дозе 2,0 мл.

Все полученные сыворотки крови от лабораторных и естественно-восприимчивых животных были испытаны по превентивной активности для золотистых хомячков, зараженных 10 LD₅₀ вирулентного штамма лептоспир. Все сыворотки имели высокую степень защиты (не менее 40%).

Поскольку разработанные вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л предназначены для профилактики абортосиндромной этиологии у коров, а также для создания колострального иммунитета у новорожденных телят, нами были проведены опыты по определению: сроков вакцинации крупного рогатого скота с целью профилактики абортосиндромной этиологии; гуморального иммунного ответа у глубоководных коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л; колострального иммунитета у телят, полученных от иммунизированных матерей.

Полученные результаты дают основание рекомендовать с целью профилактики абортосиндромной вирусной и лептоспирозной этиологии проводить вакцинацию коров двукратно внутримышечно с интервалом 14 суток за 2-3 недели до осеменения в дозе 3,0 мл.

При работе со стельными животными особую актуальность приобретает контроль безвредности препаратов. Предварительно проведенные испытания препаратов на лабораторных животных, а затем и крупном рогатом скоте разных возрастных категорий, показали, что изучаемые вакцины являются безвредными при соблюдении рекомендуемых требований.

При введении вакцин глубоководным коровам в дозе 2,0 мл и 3,0 мл отмечали иммунный ответ ко всем антигенам, входящим в состав вакцин, но наиболее высокий уровень антител отмечали при введении вакцин в дозе 3,0 мл.

При оценке колострального иммунитета у телят, полученных от иммунизированных матерей, особо следили за своевременной, не позднее двух часов после отела, выпойкой молозива. Формирование колострального иммунитета подтверждается высокими титрами специфических антител к вирусным компонентам и превентивной активностью к лептоспирам, которые сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Наиболее высокая превентивная активность отмечена при введении вакцины стельным коровам в дозе 3,0 мл.

В данных опытах установлена зависимость между содержанием специфических колостральных антител в сыворотке крови телят и титром специфических антител в сыворотке крови вакцинированных матерей и их молозиве. Наиболее высокие титры антител отмечали у телят, получавших молозиво от матерей, вакцинированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в дозе 3,0 мл. Аналогичные результаты получены по превентивной активности сыворотки крови телят. Таким образом, данная коррелятивная связь подтверждена по отношению как к вирусному, так и к лептоспирозному компонентам. У телят, рожденных от иммунизированных коров, уровень защитных антител к соответствующим возбудителям, входящим в состав вакцины, был в 9-41 раз выше, чем у телят, полученных от не иммунизированных животных, что еще раз подтверждает высокий иммунный статус вакцинированных коров. Как и в предыдущих опытах, сыворотку крови новорожденных телят опытной и контрольной (телята от не иммунизированных животных) групп проверили по превентивной активности на золотистых хомячках. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени защиты телят, полученных от коров иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Сыворотка крови телят, полученных от не вакцинированных коров, не защищала телят от инфицирования лептоспирами.

Кроме того, во всех группах иммунизированных животных не было отмечено ни одного случая аборта или мертворождения.

Полученные результаты опытов на лабораторных и естественно-восприимчивых животных показали безопасность и эффективность разработанных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, что позволило подготовить и утвердить необходимую нормативную документацию на препараты. Разработанные нами средства специфической профилактики абортов инфекционной этиологии у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у молодняка построены с учетом этиологического спектра возбудителей болезней и эффективны при применении в неблагополучных по данным инфекциям хозяйствах.

5. ВЫВОДЫ

1. Мониторинг распространенности и этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации за период с 1996 по 2011 гг. показал, что лептоспироз распространен во всех регионах РФ. Этиологическая структура лептоспироза КРС в РФ представлена лептоспирами серологических групп Sejroe (21,0%), Hebdomadis (20,5%), Grippotyphosa (7,1%), Tarassovi (7,0%) и Pomona (5,7%).

2. Инфицированность крупного рогатого скота по РФ составила 19,3%. Отмечена четкая тенденция к снижению инфицированности лептоспирозом крупного рогатого скота с 25,1% в 1996 г до 9,4% в 2011 г.

3. Определен состав вакцины для профилактики абортос инфекционной этиологии у крупного рогатого скота и создания колюстрального иммунитета у телят - КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л на основе двух (вирусы ИРТ, ВД) – четырех (вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ) вирусов и лептоспир серологических групп Grippotyphosa, Tarassovi, Pomona и Sejroe.

4. Экспериментальным путем подобраны оптимальные соотношения вирусных и бактериального компонентов в вакцинах КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, которые исключают процессы интерференции между антигенами. Отработана схема изготовления вакцины. В качестве адьюванта использован гидрат окиси алюминия.

5. В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанные вакцины безвредны, обладают выраженной антигенной и иммуногенной активностью и обеспечивают формирование гуморального иммунного ответа у морских свинок и кроликов, а также стабильно сохраняют все биологические свойства в течение срока хранения.

6. В опытах на естественно-восприимчивых животных разработаны схемы применения, сроки вакцинации и оптимальная иммунизирующая доза инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Иммунизирующая доза для коров составила 3,0 мл, а для телят –

2,0 мл.

7. С целью профилактики и предотвращения абортосиндромов инфекционной этиологии у коров вакцину КОМБОВАК 2+Л применяют двукратно с интервалом 14 суток за 2-3 недели до осеменения. С целью создания колострального иммунитета у потомства вакцинируют глубокостельных коров вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л двукратно за 50-60 суток до отела. Уровень специфических антител в 9-41 раз выше у телят, полученных от вакцинированных коров, чем у телят, полученных от не иммунизированных животных. Также у телят от вакцинированных коров высокий уровень превентивной активности сыворотки крови.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы исследований по разработке и применению инактивированных комбинированных вакцин вошли в следующие нормативные документы:

- внесены изменения в Технологический регламент на «Вакцины инактивированные против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота (КОМБОВАК)»;

- СТО «Вакцины инактивированные против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота (КОМБОВАК)»;

- Инструкцию по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л);

- Инструкцию по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л);

- СТО «Штаммы производственные вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиального, рота- и коронавируса крупного рогатого скота»

- СТО «Производственные штаммы лептоспир».

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева И.Г. Средства, методы лечения, профилактики и иммунокоррекции при инфекционных болезнях КРС смешанной этиологии: дисс.... канд. ветер. наук – Омск. - 2013. – 197 с.

2. Ананьина Ю.В. Зоонозы: роль в инфекционной патологии человека и тенденции эпидемического проявления / Ю.В. Ананьина // Ветеринарная патология. - 2004. - № 3. - С. 27-31.

3. Ананьина Ю.В. Современные тенденции эпидемического проявления природных и техногенных очагов лептоспирозов / Ю.В. Ананьина // Лептоспироз: материалы Всероссийской научно- практической конференции, Анапа. – 2003. - С. 40-42.

4. Андреев Е.В. Герпетическая инфекция быков-производителей / Е.В. Андреев, Н.П. Чечеткин, О.В. Дудник // Ветеринария. – 1977. - №9. – С. 56-57.

5. Атамась В.А. Изучение хламидиоза и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / В.А. Атамась, И.Г. Лаврова, С.И. Масленикова, В.А. Баранов // Современные аспекты профилактики инфекционных болезней молодняка. – 1985. – С. 32-34.

6. Ахмедов М.М. Методические указания по диагностике и профилактике лептоспироза сельскохозяйственных животных. - М.М. Ахмедов, И.И. Аллахвердиев, С.Ш. Кабардиев – Махачкала. – 1999. - С. 3-10.

7. Ахмедов М.М. Эпизоотологическая и эпидемиологическая характеристика лептоспироза в Республике Дагестан / М.М. Ахмедов, З.М. Джамбулатов, А.Н. Исаев // Материалы 10-й Всеросс. науч. производ. конференции. - Анапа. – 2003.- С. 3-4.

8. Бабурина Т.М. Сравнительная чувствительность методов диагностики ротавирусной инфекции КРС / Т.М. Бабурина, Ю.В. Пантелеев, А.И. Бугаева // Проблемы биологии и патологии с/х животных. – 1987. – С. 100-103.

9. Барышников П.И. Распространение лептоспироза с/х животных в

Алтайском крае / Барышников П.И. // Материалы 10-й Всеросс. науч. произв. конф.. - Анапа. – 2003. - С. 4-6.

10. Басова Н.Ю. Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях / Н.Ю. Басова, А.Г. Шипицин, В.В. Бель // Распространение респираторных болезней молодняка КРС в Краснодарском крае. Междунар. науч.-практ. конф.. – Воронеж. - 2002. – С. 129-130.

11. Белоусов В.И. Лептоспироз животных в Российской Федерации и меры борьбы с ним / В.И. Белоусов, В.Н. Абрамов, М.В. Калмыков // Материалы 10-й Всеросс. науч. произв. конф.. - Анапа. – 2003. - С. 6-10.

12. Болоцкий И.А. Изучение эффективных лептоспирозных поливакцин на сельскохозяйственных животных/ И.А. Болоцкий, В.И. Семенцов, М.Ф. Резникова// Лептоспирозы: тезисы доклада VII Всероссийской конференции по лептоспирозам.- Тбилиси. - 1983. - С. 271-272.

13. Бузлама В.С. Экологические аспекты патологии животных / В.С. Бузлама // Материалы международной научной и производственной конференции. – Воронеж. – 1999. – С. 239-240.

14. Верховская А.Е. Разработка и оценка эффективности вакцин Комбовак-Р и Комбовак-К: диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. – Владимир. – 2008. – 135 с.

15. Верховская А.Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А.Е. Верховская, В.А. Сергеев, Т.И. Алипер, Е.В. Иванов // Ветеринария. – 2009. - № 8. – С. 3-7.

16. Вишняков И.Ф. Коронавирусные инфекции животных. / Вишняков И.Ф. Лагуткин Н.А., Стрижаков А.А. и др. – Покров. – 1997. – 69 с.

17. Волосков П.А. Основы борьбы с бесплодием КРС. - М.: Сельхозгид, 1960. – С. 67-84.

18. Воронин Е.С. Современная концепция этиологии, профилактики и лечения болезней молодняка с/х животных / Е.С. Воронин, А.Г. Шахов //

Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России. – 1999. – С. 209-214.

19. Высокопоясный А.И. Респираторные болезни телят на Кубани / А.И. Высокопоясный, Н.Ю. Басов, А.Г. Шахов, А.Г. Шипицын // Ветеринария. – 2000. - №2. – С. 8-11.

20. Гамалея Н.Ф. Инфекция и иммунитет. – М., 1939. – С.13-21.

21. Гаффаров Х.З. Моно- и смешанные инфекционные диареи телят и поросят / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов, А.З. Равилов // Казань: Фен. - 2002. – С. 38-39.

22. Глотов А.Г. Эффективность вакцинации при профилактике аборт, вызванных вирусом диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота /А.Г. Глотов, В.В. Краснов, Т.И. Глотова // Вестник КрасГАУ. - 2010. - № 8. - С. 89-94.

23. Глотов А.Г. Вирусная диарея - болезнь слизистых КРС (историческая справка, характеристика возбудителя, особенности эпизоотологии, клиническое проявление и экономическое значение): мет. рекомендации / А.Г. Глотов с соавт. – Новосибирск. – 2006. – 28 с.

24. Глотов А.Г. ИРТ КРС: Особенности эпизоотологии, клинического проявления и диагностика методом гибридизации / А.Г. Глотов // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве. – Новосибирск. - 1999. – С. 205-211.

25. Глотов А.Г. Распространение вирусных респираторных болезней КРС / А.Г. Глотов и соавт.// Ветеринария. – 2002. - №3. - С. 17-21.

26. Глотов А.Г. Связь между введением контаминированной вирусом спермы в хозяйство и заболеванием коров и телят инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота / А.Г. Глотов // Актуальные вопросы ветеринарии. – Новосибирск. – 1997. – С. 54-55.

27. Готов А.Г. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизводства крупного рогатого скота / А.Г. Готов, Т.И. Глотова // Ветеринария.- № 4. – 2015. - С 3.

28. Готов А.Г. Проявление инфекционного ринотрахеита у телят раннего возраста / А.Г. Готов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова // Ветеринария. - № 12. – 2013. - С 11.

29. Глотова Т.И. Инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея крупного рогатого скота (диагностика, молекулярно-биологические свойства возбудителей, эффективность противовирусных препаратов): диссер..... доктора биологических наук. - Новосибирск. - 2006. - 364 с.

30. Глушков А.А. Клинико-эпизоотологические особенности бессимптомного лептоспироза КРС и меры борьбы с ним / А.А. Глушков, В.И. Белоусов // Новые методы диагностики, лечения и профилактики неинфекционных и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных. - Москва. – 1979. - С. 72-73.

31. Глушков А.А. Лептоспироз животных / Лекция МВА. - М.,1983. - 55 с.

32. Гоппе В.А. Этиологическое значение вирусов инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых в возникновении респираторных болезней телят: диссер.... канд. ветеринарных наук. – Новосибирск. – 2005. – 152 с.

33. Гулюкин М.И. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых КРС в животноводческих хозяйствах Российской Федерации/ М.И. Гулюкин и др.// Вопросы вирусологии. - №6. – том 58. – 2013. – С. 13-17.

34. Гулюкин М.И. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий против инфекционных болезней КРС в хозяйствах Российской Федерации / М.И. Гулюкин, К.П. Юров, Ю.Д, Караваев и др.// ГНУ ВИЭВ, ФГУ «Центр ветеринарии». – М., 2007. – С.14.

35. Гуненко В.В. Вирусные и хламидозные респираторные и кишечные инфекции КРС / В.В. Гуненко, Г.А. Халенев, В.Н. Сюрин // Животноводство и ветеринария. –1975. – Т. 8. – С. 5-131.

36. Джупина С.И. Теория эпизоотического процесса / С.И. Джупина // Ветеринария.- 1997.- №2. - С. 15-19.

37. Джупина С.И. Этиология и профилактика массовых желудочно-кишечных болезней телят / С.И. Джупина // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. – Воронеж. – 2002. – С. 15.

38. Донник И.М. Профилактика смешанных вирусно-бактериальных респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота / И.М. Донник, И.А. Шкуратова, Е.Н. Шилова и др. // Научно-методические рекомендации. - Екатеринбург.- 2009. – 35 с.

39. Дроздов С.Г. Ротавирусный гастроэнтерит. - С.Г. Дроздов, В.И. Покровский, Л.А. Шекоян, В.П. Машилов - М.: Медицина, 1982. – 160 с.

40. Жаров А.В. Вскрытие и патологоанатомическая диагностика болезней с/х животных / А.В. Жаров, В.П. Шмиков, М.С. Жаков и др. – М.: Колос, 2001. – 568 с.

41. Жидков С.А. Роль вирусной диареи в этиологии респираторных и желудочно-кишечных болезней телят / С.А. Жидков, А.И. Лебедев, М.М. Гоголев, Г.Ф. Коромыслов // Вестник Российской академии с/х наук. – 1995. - №3. – С. 50-53.

42. Заянчковский И.Ф. Задержание последа и послеродовые заболевания у коров / И.Ф. Заянчковский. - М.: Колос, 1964. – С. 23-26.

43. Иванова И.П. Инфицированность стад крупного рогатого скота в хозяйствах Минской области / И.П. Иванова, П.А. Красочко // Актуальные проблемы патологии с/х животных: материалы междунар. конф.. – Минск. – 2000. – С. 105-106.

44. Кадыров Р.А. Ассоциированная и комплексная вакцинация животных./ Р.А. Кадыров, Ю.А. Сафаров. – Москва. - 1974. – С. 271.

45. Коннов Н.М. Инфекционный ринотрахеит-баланопостит у откормочных бычков / Н.М. Коннов// Научные труды КВИ. – 1980. – 133. – С. 9-12.

46. Красиков А.П. Ассоциативные инфекционные болезни телят/ А.П. Красиков, В.И. Афанасенко// Омск. – 2008. – С. 230.

47. Красиков А.П. Комплексная диагностика ассоциативных инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красиков, И.Г. Трофимов, И.Г. Алексеева, М.В. Заболотных // Ветеринарная патология. - № 1. – 2014. – С. 13-19.

48. Красочко П.А. Болезни крупного рогатого скота и свиней / П.А. Красочко, О.Г.Новиков, А.И. Ятусевич // Под общ. ред. П.А. Красочко. Мн.: Технопринт, 2003. – С.375 – 387.

49. Красочко П.А. Эпизоотологическое обследование коров на вирусы ИРТ и ВД по наличию антител в сборном молоке / П.А. Красочко // Тезисы докладов III Всесоюзной конф. по эпизоот.. – Новосибирск. – 1991. – С. 123-124.

50. Крюков Н.Н. Инфекционный ринотрахеит – пустулезный вульвовагинит крупного рогатого скота / Итоги науки и техники / Н.Н. Крюков // Животноводство и ветеринария. – М.: 1980. – С. 32-113.

51. Макаримов А.С. Специфическая профилактика вирусных заболеваний КРС в Республике Удмуртия / А.С. Макаримов, Г.Н. Бурдов, О.В. Сергеев, В.А. Сергеев // Ветеринария. – 2008. - №10. – С. 12-18.

52. Малахов Ю.А. Метод оценки напряженности противолептоспирозного иммунитета у сельскохозяйственных животных/ Ю.А. Малахов, И.Г. Серегин, А.И. Шуплико // Лептоспироз: тезисы доклада VI Всесоюзной научной конференции по лептоспирозу.- Баку, 1975. - С. 208-210.

53. Малахов Ю.А. Особенности эпизоотологии, совершенствование диагностики и специфической профилактики лептоспироза

сельскохозяйственных животных: диссер.... доктора ветеринарных наук. – Москва. - 1978. – 350 с.

54. Малахов Ю.А. Оценка лабораторных методов диагностики лептоспироза животных/ Ю.А. Малахов, А.П. Панин, Е.В. Викторова// Лептоспироз: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Анапа. - 2003.- С. 108-109.

55. Малахов Ю.А. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу в России/ Ю.А. Малахов, А.П. Панин, Г.Л. Соболева, О.А. Лебедев, Е.В. Викторова// Ветеринария. - 2000. - №7. - С 6-8.

56. Малахов Ю.А. Лептоспироз свиней./ Ю.А. Малахов, Р.М. Алехин / М.: Колос, 1976. - С. 144.

57. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных. / Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева / Ярославль.: ДиА-пресс, 2001. – 584 с.

58. Малявин А.Г. Специфическая активность поливалентной лептоспирозной вакцины / А.Г. Малявин, В.С. Соловьева, А.Н. Шуплико // Ветеринария. – 1965. - №6. – С. 37-39.

59. Михайлов Н.Н. Роль вирусов в патологии репродукции животных/ Н.Н. Михайлов, Л.С. Ильясова // Труды ВИЭВ, М.. - 1985. – Вып. 63. – С. 34-42.

60. Мищенко В.А. Современное состояние проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота / В.А. Мищенко с соавт. // Диагностика, профилактика и лечение болезней животных: сборник научных трудов. - Новосибирск, 2008. – 176 с.

61. Мищенко В.А. Экологические особенности коронавирусной инфекции крупного рогатого скота / В.А. Мищенко // Вет. мед. - Харьков, 2004. - С. 841-845.

62. Мищенко В.А. Коронавирусная инфекция взрослого крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, В.В. Думова, О.И. Гетманский и др. // Ветеринарная патология. – 2005. - № 3. — С. 31-34.

63. Науменков В.И. Вопросы этиологии и динамики эпизоотического процесса при вирусных пневмоэнтеритах телят / В.И. Науменков // Ветеринария. – 1994. - №2. – С. 23-24.

64. Никаноров Н.Н. Проблемы ассоциированной комплексной вакцинации животных и ее практическое значение / Н.Н. Никаноров, Б.Г. Трухманов // Комплексная вакцинация в интенсивном животноводстве и ее экономическая эффективность. – Кировабад, 1983. – С.134-146.

65. Панин А.П. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза животных в России / А.П. Панин, Ю.А. Малахов, Г.Л. Соболева и др. // Проблемы биологии и экологической безопасности. - Оболенск, 2000. - С. 139-140.

66. Петрова О.Г. Особенности эпизоотической ситуации по вирусной диарее – болезни слизистых КРС в племенных хозяйствах Среднего Урала / О.Г. Петрова и соавт. // Актуальные вопросы биологии-экологии и вет. медицины домашних животных: сб. науч. тр. – Тюмень, 2002. – С. 83-85.

67. Петрова О.Г. Острые респираторные вирусные инфекции КРС в племенных хозяйствах среднего Урала и оптимизация системы противоэпизоотических мероприятий: автореф. дис. ... доктора вет. наук. - Москва, 2002. – 47 с.

68. Петрова О.Г. Острые респираторные заболевания КРС / О.Г. Петрова и соавт. – Екатеринбург.: Уральское издательство, 2007. – 278 с.

69. Полянцев Н.И. Биотехнический контроль воспроизводства в скотоводстве / Н.И. Полянцев // Зоотехния. – 1997. – № 11. – С. 25 – 27.

70. Пономаренко А. Депрессия репродуктивной функции при ИТР-ПВВ КРС / А. Пономапенко // Успехи современного естествознания. – 2014. - № 8. – С. 68-69.

71. Решетникова Н.М. Воспроизводство стада – проблема комплексная – / Н.М. Решетникова // Новое сельское хозяйство. - 2002. – № 2. – С. 32 - 35.

72. Самохвалов А.П. Антигенные и иммуногенные свойства лептоспир: диссер. на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. - Покров, 1976. - 150 с.

73. Сергеев В.А. Всероссийский ветеринарный конгресс. - Москва, 2005. – С. 35.

74. Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины. / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер/ - М., 2007. - 524 с.

75. Сергеев В.А.// Ветеринария. – 2005. - № 4. - № 6.

76. Сергеев О.В. Иммунобиологические и патогенетические особенности вирусной диареи крупного рогатого скота/ О.В. Сергеев// Ветеринария Кубани. - 2009. - №5. - С. 16.

77. Сергиенко А.И. Профилактика бесплодия КРС / А.И. Сергиенко // М.: Колос, 1984. – 186 с.

78. Сергиенко А.И. Оплодотворяемость ооцитов КРС спермой, экспериментально индуцированной вирусом инфекционного ринотрахеита / А.И. Сергиенко, В.В. Гуненков, И.К. Авдосьева, Р.В. Урус // Тезисы докладов. – Львов, 1988. – С. 87.

79. Сисягин П.Н. Профилактика вирусных респираторных болезней телят / П.Н. Сисягин с соавт. // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Междунар. науч.-практ. конф. (Воронеж, 25 сент. 2002). – Воронеж, 2002. – С. 38-39.

80. Соболева Г.Л. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза животных в России/ Г.Л.Соболева, А.П. Панин, Ю.А. Малахов// Ветеринария. – 2000. - №12. - С. 11-14.

81. Соболева Г.Л. Распространенность, этиологическая структура и специфическая профилактика лептоспироза животных: диссер... доктора биологических наук. – Москва, 2001. – 350 с.

82. Строганова И.Я. Анализ распространения вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в двух регионах Восточной Сибири / И.Я. Строганова // Вестник КрасГАУ. – 2011. - № 5. – С. 124-127.

83. Студенцов А.П. Ветеринарное акушерство и гинекология / А.П. Студенцов, В.С. Шпилов, Л.Г. Субботина, О.Н. Преображенский // М.: Агропромиздат, 1986. – 480 с.

84. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных. / Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., и др. // М.: ВНИИТИБ, 1998. – 928 с.

85. Урбан В.П. Иммунопрофилактика инфекционных болезней животных/ В.П. Урбан// Проблемы ветеринарной иммунологии. - М., 1985.- С. 13-15.

86. Фарботко Г.Э. Эпизоотическая обстановка по инфекционному ринотрахеиту КРС на племпредприятии / Г.Э. Фарботко, К.Н. Кондрахина, Л.Д. Павлова // Ветеринария. – 1994. - №8. – С. 27-30.

87. Федоров Ю.Н. Иммунный статус и инфекционные болезни новорожденных телят и поросят / Ю.Н. Федоров // Ветеринария. – 2006. - № 11.- С. 3-5.

88. Фельдман И.И. Эпизоотический процесс в различные эпохи развития общества и проблема ликвидации инфекционных болезней / И.И. Фельдман // Эпизоотология и меры борьбы с инфекционными болезнями животных. – М., 1985. – С. 19-27.

89. Хараламбиев Х.Е. Проучвания вързу корона- и ротавирусните ентерити по новородените телята у нас. / Х.Е.Хараламбиев, Г.К. Георгиев, Б. Митов // Вет. мед. Науки. - 1987. - С. 102-113.

90. Хилькевин С.Н. Пути и методы интенсификации воспроизводства в скотоводстве: автор. дисс... док. биол. наук. - Дубровицы, МО, 1996. – 39 с.

91. Хитрова А.Е. Эффективность применения комбинированных вакцин серии Комбовак / А.Е. Хитрова, В.А. Сергеев, Т.И. Алипер, О.А. Верховский // Ветеринария. – 2006. - № 9. – С. 17-20.

92. Череватенко Л.Н. Распространенность и роль сероваров лептоспир в патологии воспроизводства у крупного рогатого скота / Л.Н. Череватенко // Материалы Всесоюзной конференции.- Львов, 1988. - С. 23-26.

93. Чернуха Ю.Г. К вопросу о механизме обмена возбудителями между дикими и домашними животными. / Ю.Г. Чернуха // Тезисы доклада X Всесоюзной конференции по природной очаговости болезней. - Душанбе, 1979. - Дониш, 1979. - С. 242-243.

94. Чехович А.В. Заражаемость крупного рогатого скота в природном очаге лептоспирозов / А.В. Чехович // Тезисы докладов I Всесоюзной конференции. - М., 1988.- С. 63-64.

95. Шахов А.Г. Нарушение обмена веществ у стельных коров / А.Г. Шахов, В.Т. Самохин // Матер. круглого стола отд. ветеринар. медицины РАСХН. - М., 2000. - С. 10-14.

96. Шилова Е.Н. Колостральный иммунитет у телят при вакцинации коров-матерей против ОРВИ / Е.Н. Шилова // Аграрный вестник Урала. – 2011. - № 8 (87). – С. 30.

97. Шилова Е.Н. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота в Уральском регионе / Е.Н. Шилова, М.В. Ряпосова, И.А. Шкуратова, И.В. Вялых // Ветеринария. – 2014. - № 5. – С. 19

98. Шипицин А.Г. Особенности течения респираторных болезней телят на комплексах и в хозяйствах – репродукторах в Краснодарском крае / А.Г. Шипицин // Профилактика и лечение респираторных болезней телят в современных экологических условиях: мат. науч.-практ. конф. – Иркутск, 2001. – С. 80.

99. Шпякин Ю.А. Вирусная диарея КРС (эпизоотология, диагностика и меры борьбы) / Ю.А. Шпякин, Н.И. Закутский // Актуальные проблемы инфекционной патологии вет. медицины: матер. конф. молодых ученых (Покров, 3 дек. 2009). – Покров, 2009. – С. 66-71.

100. Шульпин М.И. Индикация вируса диареи КРС, генотипирование и филогенетический анализ изолятов, выявленных на территории РФ / М.И. Шульпин, П.К. Аялот, В.А. Мищенко // Вопросы вирусологии. – 2003. - №5. – С. 41-46.

101. Щекотурова Т.В. Лептоспироз животных на севере России и эффективность лептоспирозных мероприятий / Т.В. Щекотурова, В.Л. Щекотуров, В.В. Сочнев // Научные и практические аспекты увеличения мяса НЗ России: тезисы доклада научной конференции. - Санкт-Петербург, 1993. - С. 111-113.

102. Юров К.П. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек КРС в различных регионах России / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, О.Г. Петрова, О.В. Майджи // Труды ВИЭВ. – 2003. - №73. – С. 15-22.

103. Acres S.D. Studies on rotaviral antibody in bovine serum and lacteal secretions, using radioimmunoassay / S.D. Acres, L.A. Babiuk // J. Amer. Vet. Med. Assn. – 1987. - Vol. 173. - №5 (2). - P. 551-559.

104. Babiuk L.A. Immunology of bovine herpesvirus I infection/ L.A. Babiuk, S. Van Drunen Little-van den Hurk, S.K. Tikoo// Vet. Microbiol. – 1996.- Vol. 53. - № 1-2. - P. 31-42.

105. Babudieri B. Vaccine against leptospirosis «Free. Sth. int. Hectboil/ B. Babudieri// Standor- disation, Jerasolim. – 1959. – P. 313-350.

106. Belknap E.B. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1, 3 / E.B. Belknap, J.K. Collins, V.K. Ayers // Vet. Pathol. – 1994. – Vol. 31. - №3. – P. 358-365.

107. Bitsch V. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with special reference to preputial infection / V. Bitsch // Appl. Microbiol. – 1973. - Vol. 26. – P. 337-343.

108. Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // Nord. Veter. Med. – 1978. – Vol. 30. - №4/5. – P. 178-185.

109. Bournsnel M.E.G. Sequencing of coronavirus IBR genomic RNA: A 195-base open reading frame encoded by mRNA / M.E.G. Bournsnel, T.D.K. Brown // Gene. – 1984. – Vol. 29. – P. 87-92.

110. Bridger J.C. Neonatal calf diarrhoea identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy / J.C. Bridger, G.N. Woode // Brit. Vet. J. – 1975. - V. 131. - № 5. - P. 528-535.

111. Bryan L.A. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves / L.A. Bryan, R.A. Fenton, V. Misra, D.M. Haines // Can Vet J. – 1994. – № 35 (4). – P. 223-228.

112. Collinns J.K. Shedding of enteric coronavirus in adult cattle / J.K. Collinns, C.A. Riegel, J.D. Olson, A. Fountain // Am. J. Vet. Res. – 1987. – Vol. 48. – P. 361-365.

113. Cravens R.L. Efficacy of a temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus type-1 vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers / R.L. Cravens, M.A. Ellsworth, C.D. Sorensen, A.K. White // J. Am. Veter. Med. Assn. – 1996. – Vol. 208. - № 12. – P. 2031-2034.

114. Dahme E. IBR-IPV – Infektionen des Z 1, Tierarztl / E. Dahme // Umschau. – 1984. – 39. - №5. – P. 375-376.

115. De B.N. Investigation of an outbreak of bovine abortion in a large organized dairy farm / B.N. De, A. Chatterjee, G. Biswas // Indian Veter. J. – 1989. – T. 66. - № 4. – P. 283-287.

116. Delhon G. Identification of DNA sequences in the latency related promoted promoter of bovine herpesvirus 1 which are bound by neuronal specific factors / G. Delhon, C. Jones // Virus res. – 1997. – Sep. Vol. 51. - № 1. – P. 93-103.

117. Deptula W. Nieswoistai swoista odpomosc komorkova u buhajow zakazonich naturalnie wirusem IBR/IPV (Bovid herpes virus – 1) / W. Deptula // Med. Vet. – 1992. – Vol. 48. - № 6. – P. 276-279.

118. Durhan P.J.K. Rotavirus and coronavirus induced diarrhea in Zealand cattle / P.J.K. Durhan // 47 Session Generale du Comite de I.O.J.E. - Paris, 21-26 mai. – 1979. - Rapport 106. - H. 9.

119. Ellens D.J. De Neonatale diarrhea by Kalveren / D.J. Ellens, P.W. Lecuw // Tidschr. Diergeneesk. – 1980. - Vol. 195. - №16. - P. 644-649.

120. Ellis W.A. Bovine leptospirosis: Some clinical features of serovar hardjoe infection / W.A. Ellis, J.J. O'Brien, N.G. Bryson, D.P. Mackie // Veter. Rec. – 1985. – Vol. 117. - № 5. – P. 101-104.

121. Ellis W.A. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjoe following calving or abortion / W.A. Ellis, J.J. O'Brien, J.A. Cassells // Res. in veter. Sc. – 1985. - Vol. 39. - P. 296-298.

122. Espinasse J. Different aspects de la rhinotracheite infectieuse bovine (IBR/IPV) dans un troupe, aulaitier du sud – ouest de la France / J. Espinasse et al.// Rev. Med. Vet. – 1974. – Vol. 125. – P. 1441-1452.

123. Frey M. Bovine respiratory syncytial virus acute respiratory distress syndrome in cattle / M. Frey // Irish Veter. News. – 1984. – November. – P. 27-33.

124. Fulton R.W. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination / R.W. Fulton, R.E. Briggs, M.E. Payton et al.// Vaccine.- 2004.- Vol. 22. - P. 643-649.

125. Genov I. Vulvovaginitis, keratoconjunctivitis and a respiratory syndrome occurring at the same time in calves / I. Genov, P. Marinov et al. // Abatr. Bulg. sci. Lit. Ser. – 1975. – B. 20. - № 2. – P. 35.

126. Gimeno E.J. Immunohistokemikst pavisande av bovinitt herpesvirus typ 1 I snitt fran nervvavnad / E.J. Gimeno, G. Ibaroyer, K. Belak, H.R. Sanguinett // Sven. Veterinartin. – 1990. – Vol. 42. - № 15. – P. 653-655.

127. Granger L.M. Prevalence and Control of Bovine Viral Diarrhea Virus on U. S. Caw – calf Operations. USA.: USDA Press, 2008.

128. Hage J.J. Population dynamics of bovine herpesvirus I infection in a dairy herd / J.J. Hage, Y.H. Schukken, H.W. Barkema et al. // Vet. Microbiol. – 1996. – Vol. 53. - № 1-2. – P. 169-180.

129. Haralambiev H.T. Isolation of bovine corona and rota viruses in organ cultures from respiratory mucosa / H.T. Haralambiev, B.K. Mitov // – 1979. – Vol. 32. - №11. – P. 1597-1600.

130. Houe H. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate / H. Houe, K. Myrup-Pedersen, A. Meyling // Prev. Vet. Med. -1993. -№ 5. - P. 117–123.

131. Johannsen U. Pathologia und Pathogenese von virusenteritiden bei Tieren / U. Johannsen // Med. – 1983. - Vol. 37. - № 1. - P. 143-149.

132. Jubb K.V.P. Pathology of Domestic Animals / K.V.P. Jubb // Ist ed, New York Academic Pr. – 1963. – Vol 2. - P. 12-21.

133. Kaaden O.R. Persistierende virusinfektionen – mechanismen und konsequenzen / O.R. Kaaden // Biol. Tiermed. – 1992. – Vol. 9. - № 4. – P. 135-136.

134. Kelling C.L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines/ C.L. Kelling// Vet Clin Food Anim. – 2004. - Vol. 20. - P. 115-129.

135. Lecuw P.W. Rotavirus infection in calves in dairy herds / P.W. Lecuw, D.J. Ellens, P.J. Straver // Res. Vet. Sei. – 1980/ - Vol. 29. - № 2. - P. 135-141.

136. Libbs E.P.J. Use corticosteroids to isolate IBR virus from cattle in Cyprus after respiratory disease and atania / E.P.J. Libbs, L. Pitrolas, M.J.P. Zauman // Vet. Rec. – 1975. – Vol. 96. - № 21. – P. 464-466.

137. Lindberg A.L.E. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A

review /A.L.E. Lindberg // *Veter. Quarterly.* –2003. - Vol. 5. - № 1. - P. 1-16.

138. Ludwig H. Studies on the relatedness of herpesviruses through DNA – DNA hidridization / H. Ludwig et al. // *Virology.* – 1972. - Vol. 49. – P. 95-101.

139. Ludwig H. Activation of herpesvirus from normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation / H. Ludwig, J. Storz // *Med. Microbiolog. Immunol.* - 1973. - Vol. 158. - P. 209-217.

140. M.D. Fray. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow / M.D. Fray, G.E. Mann, M.C. Clarke, B. Charleston // *Vet. Microbiol.*-2000. – 77. - P. 185–194.

141. Mebus C.A. Immunity to neonatal calf diarrhea virus / C.A. Mebus, R.G. White, E.P. Baas, M.J. Twiehaus // *J. Am. Vet. Med. Assn.* – 1973. - Vol.163. - №7. - P. 880-883.

142. Miller J.M. Experimentally induced infectious bovine thinotracheitis virus infection during early pregnancy: Effect on the bovine corpus luteum and conceptus / J.M. Miller, M.J. Van Der Maaten // *Am. J. Vet. Res.* – 1986. – 1986. - № 2. – P. 223-228.

143. Miller J.M. Infertility in heifers inoculated with modified-live bovine herpesvirus-1 vaccinal strains against infectious bovine rhinotracheitis on postbreeding day 14 / J.M. Miller, M.J. Van der Maaten, C.A. Whetstone // *Am. J. veter. Res.* – 1989. – T. 50. - № 4. – P. 551-554.

144. Moening V. Infektionsmedizinscht Herausforderungen / V. Moening, M. Kramer // *Tierarztl. Umsch.* – 2000. – Vol. 55. - № 8-9. – P. 428-436.

145. Moon H.W. Pathogenic relationships of rotavirus, Esherichia coli, and other agents in mixed infections in calves / H.W. Moon, A.W. McClurkin, R.E. Isaacson et al. // *J. Am. Vet. Med. Ass.* – 1987. – Vol. 173. – P. 577-583.

146. Munoz M.C. Estudio morfopatologico y serologico en un brote de aborto bovino asociado al virus IBR / M.C. Munoz, N. Merino, A. Nunez // *Rev. Salud Anim.* – 1989. – T. 11. - № 2. – P. 118-124.

147. Myers L.L. Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live rotavirus – coronavirus vaccine / L.L. Myers, D.R. Snodgrass // *Am. Vet. Med. Assoc.* – 1982. – Vol. 181. – P. 486-488.

148. Nalbantov I. Rhinotracheitis enzootics in imported cows and calves attendant with conjunctivitis, abortions and encephalitis / I. Nalbantov // *Abstr. Bulg. sci. Lit. Ser.* – 1975. – B. 20. – P. 31.

149. Nandi S. Bovine herpes virus infections in cattle/ S. Nandi, M. Kumar, M. Manohar, R.S. Chauhan// *Animal Heals Res. Rev.* – 2009. - Jun; 10(1). - P. 85-98.

150. Narita M. Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with IBR-virus / M. Narita, S. Inui, G. Murakawi, K. Nanba, G. Shimizu // *J. Comp. Path.* – 1982. – Vol. 92. - № 1. - P. 41-49.

151. Norton J.I. A farming systems study of abortion in dairy cattle on the Atherton tableland. The pattern of infectious diseases / J.I. Norton, W.P. Tranter, R.S.F. Campbell // *Austral. Veter. J.* – 1989. – T.66. - №6. – P. 163-166.

152. Nylin B. Reintroduction of bovine herpes virus type 1 into Danish cattle herds during the period 1991-1995: a review of the investigations in the infected herds / B. Nylin, K.J. Madsen, L. Ronsholt // *Acta Vet. Scand.* – 1998. – Vol. 39. - №4. – P. 401-413.

153. Obando C. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela / C. Obando, C. Baule, C. Pedrique et al. // *Acta Vet. Scand.* – 1999. – 40(3). – P. 253-262.

154. Palfi V. The pathology of concurrent bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis virus infection in newborn calves / V. Palfi, R. Glavits, A. Hornyak // *Acta veter. hung.* – 1989. –T. 37. - № 1/2. – P. 89-95.

155. Pastoret P.P. Bovine herpesvirus – I infection in cattle: pathogenesis, consequences of latency / P.P. Pastoret, E. Thiry, B. Brochier, G. Derboven // *Ann. Rech. Vet.* – 1982. – Vol. 13. – P. 221-236.

156. Pastoret P.P. Epizootiology of rotavirus diarrhoea in the bovine species / P.P. Pastoret, A. Schwers // *Rev. Scient. techn. of Intern. Epizoot.* – 1984. – P. 843-853.
157. Pellerin C. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities / C. Pellerin, J. vanden Hurk et al. // *Virology.* – 1994. – Vol. 203. – P. 260-268.
158. Radostits O.M. The control of infectious diseases of the respiratory and digestive tracts of cattle/ O.M. Radostits // *Can. Vet. J.* – 1991. - Vol.32. - P. 311-314.
159. Raggio C. Infectious bovine thinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus / C. Raggio // *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* – 1997. – Vol. 13. - № 3. – P. 455-469.
160. Ramon C. Les vaccine associes pazunion d'une anatoxine et d'un vaccine microbien (TAB) on par melanges d'anatoxines / C. Ramon, C. Zoller // *C.R. Biol.* - 1926. - Vol. 94. - № 2. – P. 106-109.
161. Ridpath J.F. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves / J.F. Ridpath, J.D. Neill et al // *Am. J. Vet. Res.* – 2005. – Vol. 64. – P. 65-69.
162. Ridpath J.F. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes / J.F. Ridpath, S.R. Bolin, E.J. Dubovi // *Virology.* – 1994. – Vol. 205. – P. 66-74.
163. Rodak L. Detection by radioimmunoassay and enzymelinked immunosorbent assay of coronavirus antibodies in bovine serum and lacteal secretions / L. Rodak, L.A. Babiuk, S.D. Acres // *J. Clin. Microbiol.* – 1982. – Vol. 16. – P. 34-40.
164. Roels S. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow / S. Roels, G. Charlier, C. Letellier, G. Meyer // *Vet Microbiol.* - 2000. - Vol.146. - № 20. - P. 586-588.
165. Roizman B. Restriction on 2 analysis of herpesvirus DNA: Stability of restrict endonuclease patterns / B. Roizman, M. Tognon // *Lancet.* – 1973. – P. 167-217.

166. Rossi C.R. Association between route inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus and site of recrudescence after dexamethasone treatment / C.R. Rossi, G.K. Kinsel, P. Rumph // *Am. J. Vet. Res.* – 1982. – Vol. 43. - №8. – P. 1440-1442.

167. Rziha H.J. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues / H.J. Rziha, T.C. Mettenleiter, V. Ohlinger, G. Wittmann // *Virology.* – 1986. – Vol. 155. - № 2. – P. 600-613.

168. Schlafer D.H. Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semen or during embryo transfer / D.H. Schlafer, J.H. Gillespie, R.H. Foote // *Dt. tierarztl. Wschr.* – 1990. – T. 97. - № 2. – S. 68-72.

169. Sibelin M. Rotavirus infectionen in einem grosseren Rinderbesland / M. Sibelin, H. Szekely, F. Burki // *Wiener Tier. Monats.* - 1980. - Bd. 67. - № 4. - S. 122-127.

170. Singh E.L. The potential of semen and embryos for introducing pathogens into the uterus / E.L. Singh // *Congress proceedings.* - Vol. 5. – Abstracts, S. 1. – 1988. – P. 72-79.

171. Snodgrass D.R. Aetiology diarrhea in young calves / D.R. Snodgrass, H.R. Terzolo, D. Sherwood et al. // *Vet. Rec.* – 1986. – Vol. 119. – P. 31-34.

172. Spradbrow P.B. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen / P.B. Spradbrow // *Aust. Vet. J.* – 1968. – 44. – P. 410-412.

173. Stahl K. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru / K. Stahl, H. Rivera, I. Vagsholm, J. Moreno-Lopez // *Prev. Vet. Med.* – 2002. – 30. – 56 (3). – P. 193-202.

174. Straub O.C. Coital exantema (IBR-IPV) 11th Conference of the O.I.E. Regional commission for Europe «Aujeszky's disease, genital diseases of cattle. London recommendations, zoo-sanitary situation» / O.C. Straub, G. Wittmann // *Viena, 25-28 September 1984 (Proceeding) Paris.* – 1984. – P. 205-210.

175. Stroub O.C. Advantages in BHV-1 (IBR) research / O.C. Stroub // Dtsch Tierarztl Wochenschr. – 2001. – Vol. 108. - № 10. – P. 419-422.

176. Theil K. Affect of poly J: C on infectious bovine rhinotracheitis virus infection in calves / K. Theil et al. // Proc. Soc. Exp. Biol. - 1971. - Vol. 137. – P. 1176-1179.

177. Tikoo S.K. Bovine herpesvirus I (BHV-I): biology, pathogenesis and control // S.K. Tikoo, M. Campos, I.A. Babiuk // Adv. Virus. Res. – 1995. – 45. – P. 191-223.

178. Tolari F. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats/ F. Tolari, H. White, P. Nixon// 1990. – Vol. 13. - № 1. – P. 67-71.

179. Trapp S. Conventional and marked BHV-1 vaccines in Germany: a brief review / S. Trapp, P. Konig, M. Beer // Berl. Munch Tierarztl Wochenschr. – 2003. – 116 (5-6). – P. 208-215.

180. Treml E. Flocne nozsireni profilatch proti leptospiram v jednotiiivych zemedeskych sadoch okresu, zjstovana na zaklade Serologickeho vysetroni, jatecne – ho skotu a prasat/ E. Treml, Z. Sebek, K. Hejlicehll // Veter. Med.(Praha). – 1984. – P. 531-537.

181. Truszezynski M. Rols rota- i coronawirusow w. Schorzeniach bydta / M. Truszezynski, H. Lis // Med. Veter. - 1981. - Vol. 36. - № 6. - P. 321-323.

182. Tsunemitsu H. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea / H. Tsunemitsu, H. Yonemichi, T. Hirai et al. // J. Vet. Med. Sci. – 1991. – Vol. 53. – P. 433-437.

183. Van Der Maaten M.J. Ovarion lessions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live IBR virus on the day after breeding / M.J. Van Der Maaten, J.M. Miller // A.M.J. Vet. Res. – 1985. – Vol. 46. - № 9. – P. 1996-1999.

184. Van Drunen L. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1/ L. van Drunen, S. van den Hurk// Vet. Microbiol.- 2006. – Mar 31. - 113(3-4). - P. 275 - 282.

185. Van Oirschot J.T. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea/

J.T. Van Oirschot, C. Brusehke, P. Van Rijn // *Vet Micr.* - 1999. - Vol.64. - P. 169-183.

186. Van Schaik G. Introduction of BHV-I on dairy farms. Risk assessment by cattle farmers and veterinarians / G. Van Schaik // *Tijdschr. Diergeneeskd.* – 1998. – Vol. 15. - №123 (6). – P. 180-183.

187. Veselinovic S. Disturbances in bovine reproduction caused by action of IBR/IPV viruses / S. Veselinovic, D. Medic, V. Ivkov et al // *Proc. of the 12. Intern. Congr. on animal reproduction.* – 1992. – P. 1605-1607.

188. Vilcek S. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group / S. Vilcek et al. // *Vet. Rec.* – 2002. – Vol. 35. – P. 609-615.

189. Vonk Noordegraaf A. An epidemiological and economical simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in the Netherlands / A. Vonk Noordegraaf // *Prev. Vet. Med.* – 1998. – 1. – № 3. – P. 219-238.

190. Wiseman A. Infectious bovine rhinotracheitis / A. Wiseman // *Veter. Ann. Bristol.* – 1980. – Vol. 20. – P. 204-208.

191. Woode G.N. Viral enteritis of calves / G.N. Woode, J.C. Bridger // *Vet. Rec.* – 1975. – Vol. 96. – P. 85-88.

192. Xue W. Fetal protection against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine / W. Xue, D. Mattick, L. Smith et al. // *Can J Vet Res.* – 2009. - № 73 (4). – P. 292-297.

193. Yates W. D. Interaction between viruses and bacteria in bovine respiratory disease / W.D. Yates // *Canad. Veter. J.* – 1984. – Vol. 25. – P. 37-41.

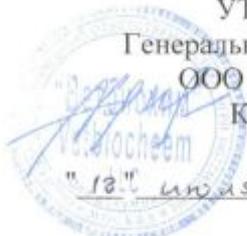
194. Young P.L. Failure to detect infection of the bovine foetus after inoculation of a prototype Australian strain of bovine herpesvirus 1 / P.L. Young, J.L. Sweeney, G.A. Smith, B.J. Rodwell // *Austral. Veter. J.* – 1994. – Vol. 71. - № 3. – P. 92-93.

195. Zygraich N. Etiologie des diarrhees neonatales du veau. Resultats d'une enquete serologique relative aux virus reo-like et corona dans la population bovine belge / N. Zygraich, A.M. Georges, E. Vascoboinic // Ann. Med. Vet. – 1975. – Vol. 119. – P. 105-113.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ВЕТБИОХИМ"

УТВЕРЖДАЮ:
Генеральный директор
ООО "Ветбиохим"
Кривонос А.В.
"18" июля 2012 г.



**ПРОМЫШЛЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ**

НА ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВАКЦИН
ИНАКТИВИРОВАННЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ
ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА, ПАРАГРИППА-3, ВИРУСНОЙ
ДИАРЕИ, РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ, РОТА- И
КОРОНАВИРУСНОЙ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(КОМБОВАК)

Москва – 2012 г.

КОПИЯ №2

ООО «Ветбиохим»

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора


Е.А. Непоклонов
« 14 » марта 2012 г.



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

А.В.Кривонос
« 14 » марта 2012 г.

СТАНДАРТ ООО «Ветбиохим»

ВАКЦИНЫ ИНАКТИВИРОВАННЫЕ КОМБИНИРОВАННЫЕ
ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА,
ПАРАГРИППА-3, ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, РЕСПИРАТОРНО-
СИНЦИТИАЛЬНОЙ, РОТА- И КОРОНАВИРУСНОЙ
БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(КОМБОВАК)

СТО 76418883-1008-2011

Технические условия
Взамен СТО 42418073-0003-2008

КОПИЯ
ВЕРНА

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Всероссийский
государственный Центр качества
и стандартизации государственных
средств для животных и кормов»,
председатель



А.Н. Данин
« 5 » мая 2012 г.

СПЕЦИАЛИСТ
ОТДЕЛА ПО НТД

ЛЕБЕДЕВА В.В.

05 МАЙ 2012

Handwritten vertical text on the left margin: "Соп. 13.02.2012" and "Соп. 14.03.2012"

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора

Н.А. Власов
2009 г.

КОПИЯ №2

ИНСТРУКЦИЯ
по применению вакцины инактивированной
комбинированной против инфекционного ринотрахеита,
вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота
(КОМБОВАК-2+Л)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота – КОМБОВАК-2+Л.
2. Вакцина изготовлена из инактивированных формалином производственных штаммов двух вирусов: инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи, инактивированных производственных штаммов лептоспир серологических групп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe с адьювантом – гидроокисью алюминия.
3. Вакцина представляет собой жидкость светло-красного цвета. Образующийся при хранении рыхлый сероватый осадок при встряхивании легко разбивается в однородную взвесь.
4. Вакцину выпускают в стеклянных или полимерных флаконах вместимостью 100,0 см³, закупоренных резиновыми пробками, укрепленных алюминиевыми колпачками. На этикетке флакона с вакциной указывают: страну, город, название организации-производителя и разработчика и/или товарный знак, название вакцины, номер серии и дату изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), количество доз вакцины во флаконе, предупредительные надписи «Стерильно», «Для животных», способ применения, меры предосторожности, номер государственной регистрации, знак соответствия в системе ГОСТ Р, условия хранения и обозначение нормативного документа.
Флаконы упаковывают в картонные (деревянные) или пенопластовые коробки (ящики) с разделительными перегородками, обеспечивающими сохранность вакцины, и наносят маркировку по ГОСТ Р 52683. Вакцина снабжена инструкцией по применению.
5. Срок годности вакцины - 18 мес от даты изготовления при условии хранения и транспортирования в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8⁰ С. Запрещено использовать вакцину по истечении срока годности.
6. Флаконы с вакциной, подвергшиеся замораживанию, без этикеток, с нарушенной закупоркой и целостностью, измененным цветом вакцины, содержащие посторонние примеси или не разбивающийся при взбалтывании осадок, а также вакцину, не использованную в день вскрытия флакона, выбраковывают и обезвреживают путем кипячения в течение 15 мин с последующей утилизацией.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Вакцина вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота к инфекциям, обусловленным вирусами инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи, а также лептоспирами четырех серогрупп: Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe, через 14 сут после второй иммунизации, который сохраняется не менее 8 мес у взрослых животных и 6 мес у молодняка в возрасте до 1 года.

СПЕЦИАЛИСТ
ОТДЕЛА ПО НТД

В.В. ЛЕБЕДЕВА

06 МАЙ 2014

КОПИЯ №2



ИНСТРУКЦИЯ
по применению вакцины инактивированной
комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи,
рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота
(КОМБОВАК-4+Л)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота – КОМБОВАК-4+Л.

2. Вакцина изготовлена из инактивированных формалином производственных штаммов четырех вирусов: инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусов, инактивированных производственных штаммов лептоспир серологических групп Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe с адьювантом – гидроокисью алюминия.

3. Вакцина представляет собой жидкость светло-красного цвета. Образующийся при хранении рыхлый сероватый осадок при встряхивании легко разбивается в гомогенную взвесь.

4. Вакцину выпускают в стеклянных или полимерных флаконах вместимостью 100,0 см³, укупоренных резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

На этикетке флакона с вакциной указывают: страну, город, название организации-производителя и разработчика и/или товарный знак, название вакцины, номер серии и дату изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), количество доз вакцины во флаконе, предупредительные надписи «Стерильно», «Для животных», способ применения, меры предосторожности, номер государственной регистрации, знак соответствия в системе ГОСТ Р, условия хранения и обозначение нормативного документа.

Флаконы упаковывают в картонные (деревянные) или пенопластовые коробки (ящики) с разделительными перегородками, обеспечивающими сохранность вакцины, и наносят маркировку по ГОСТ Р 52683. Вакцина снабжена инструкцией по применению.

5. Срок годности вакцины - 18 мес от даты изготовления при условии хранения и транспортирования в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8⁰ С. Запрещено применять вакцину по истечении срока годности.

6. Флаконы с вакциной, подвергшиеся замораживанию, без этикеток, с нарушенной укупоркой и целостностью, измененным цветом вакцины, содержащие посторонние примеси или не разбивающийся при взбалтывании осадок, а также вакцину, не использованную в день вскрытия флакона, выбраковывают и обезвреживают путем кипячения в течение 15 мин с последующей утилизацией.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

**КОПИЯ
ВЕРНА**

7. Вакцина вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота к инфекциям, обусловленным вирусами инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусами и лептоспирами четырех серологических групп: Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe, через 14 сут после второй иммунизации, который сохраняется не менее 8 мес у взрослых животных и 6 мес у молодняка в возрасте до 1 года.

СПЕЦИАЛИСТ
ОТДЕЛА ПО НТД

В.В. ЛЕБЕДЕВА

06 МАЙ 2014

ООО «Ветбиохим»

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»



А.В. Кривонос

2010 г.

ООО «Ветбиохим»

ШТАММЫ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ВИРУСОВ
ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА, ПАРАГРИППА-3,
ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО,
РОТА- И КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

СТО 76418883-0016-2010

ООО «Ветбиохим»

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»



А.В. Кривонос

«20» сентября 2010 г.

ООО «Ветбиохим»

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ШТАММЫ ЛЕПТОСПИР

СТО 76418883-0020-2010

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО Племхоз «Наро-Осановский»
А.Н.РЫХЛИК« 23 » август 2005г.

А К Т

испытания на безвредность экспериментальной серии вакцины
инактивированной комбинированной против инфекционного
ринотрахеита вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и
лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 2+Л»

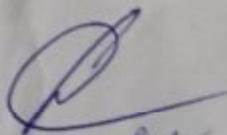
Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт в том, что с 11.08.2005г. по 21.08.2005г. нами на базе молочного комплекса «Нарский» АО Племхоз «Наро-Осановский» была испытана на безвредность вакцин «КОМБОВАК-2+Л» экспериментальной серии №1, изготовленная 07.2005г.

Вакцину вводили взрослому крупному рогатому скоту внутримышечно, в дозе 5,0 мл и телкам 10-14 месячного возраста внутримышечно в дозе 3,0 мл.

За животными наблюдали в течение 10 дней. За период наблюдений не выявлено никаких осложнений на месте введения препарата, общее состояние животных было стабильным.

Главный ветврач

Ветврач молочного к-са




Б.Р.ХМЕЛЬНИЦКИЙ

Н.Ю.ПОЛЯКОВА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО Племхоз «Наро-Осановский»
А.Н.РЫХЛИК

« 13 » августа 2005г.

А К Т

испытания на безвредность экспериментальной серии вакцины
инактивированной комбинированной против инфекционного
ринотрахеита вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и
лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 4+Л»

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт в том, что с 11.08.2005г. по 21.08.2005г. нами на базе молочного комплекса «Нарский» АО Племхоз «Наро-Осановский» была испытана на безвредность экспериментальная серия вакцины «КОМБОВАК-4+Л» экспериментальной серии №1, изготовленная 07.2005г.

Вакцину вводили взрослому крупному рогатому скоту внутримышечно, в дозе 5,0 мл и телкам 10-14 месячного возраста внутримышечно в дозе 3,0 мл.

За животными наблюдали в течение 10 дней. За период наблюдений не выявлено никаких осложнений на месте введения препарата, общее состояние животных было стабильным.

Главный ветврач



Б.Р.ХМЕЛЬНИЦКИЙ

Ветврач молочного к-са



Н.Ю.ПОЛЯКОВА

УТВЕРЖДАЮ



А К Т

**испытания на безвредность экспериментальной серии вакцины
инактивированной комбинированной против инфекционного
ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и
лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 2+Л»**

Настоящий акт составлен о том, что в 2007-2008г.г. в АО Племхоз «Наро-Осановский» Одинцовского района, Московской области были проведены производственные испытания вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 2+Л», экспериментальной серии №2, изготовленной 08.2007г.

Всего было вакцинировано 330 коров, 95 стельных коров и 105 телят 1,5-2 месячного возраста. Вакцину применяли по следующей схеме: коров и нетелей вакцинировали внутримышечно двукратно в дозе 3,0 мл, первый раз за 40-50 суток до отела, повторно через 14-21 день. Все полученные от вакцинированных коров телята своевременно, в течение первых двух часов после рождения, получали молозиво от своих матерей. Телят в возрасте 45-60 дней вакцинировали внутримышечно двукратно в дозе 2.0 мл с интервалом 14-21 день. Поствакцинальных осложнений у животных не наблюдалось.

За период производственных испытаний вакцины «КОМБОВАК 2+Л» экспериментальной серии №2, изготовленной 08.2007 г. в опытных группах животных не было ни одного случая аборта или мертворождения.

По результатам производственных испытаний вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 2+Л» экспериментальной серии №2, изготовленная 08.2007г. признана безвредной и пригодной для практического применения на крупном рогатом скоте.

Главный ветврач

Ветврач молочного к-са

Б.Р.ХМЕЛЬНИЦКИЙ

Н.Ю.ПОЛЯКОВА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО Племхоз «Наро-Осановский»
А.Н.РЫХЛИК

« 11 » марта 2008 г.

А К Т

**испытания на безвредность экспериментальной серии вакцины
инактивированной комбинированной против инфекционного
ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и
лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 4+Л»**

Настоящий акт составлен о том, что в 2007-2008г.г. в АО Племхоз «Наро-Осановский» Одинцовского района, Московской области были проведены производственные испытания вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 4+Л», экспериментальной серии №2, изготовленной 08.2007г.

Всего было вакцинировано 330 коров, 95 стельных коров и 105 телят 1,5-2 месячного возраста. Вакцину применяли по следующей схеме: коров и нетелей вакцинировали внутримышечно двукратно в дозе 3,0 мл, первый раз за 40-50 суток до отела, повторно через 14-21 день. Все полученные от вакцинированных коров телята своевременно, в течение первых двух часов после рождения, получали молозиво от своих матерей. Телят в возрасте 45-60 дней вакцинировали внутримышечно двукратно в дозе 2.0 мл с интервалом 14-21 день. Поствакцинальных осложнений у животных не наблюдалось.

За период производственных испытаний вакцины «КОМБОВАК 4+Л» экспериментальной серии №2, изготовленной 08.2007 г. в опытных группах животных не было ни одного случая аборта или мертворождения.

По результатам производственных испытаний вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота «КОМБОВАК 4+Л» экспериментальной серии №2, изготовленная 08.2007г. признана безвредной и пригодной для практического применения на крупном рогатом скоте.

Главный ветврач

Ветврач МТФ «Ерёмино»

Б.Р.ХМЕЛЬНИЦКИЙ

Г.Г.ПЕРУШКИН